

NATHALIA MARCOLINI PELUCIO PIZATO

**EFEITO DA DIETA COM DIFERENTES PROPORÇÕES DE ÁCIDOS GRAXOS
N-6:N-3 SOBRE O CRESCIMENTO TUMORAL, CAQUEXIA E SISTEMA
IMUNITÁRIO EM RATOS PORTADORES DO TUMOR DE WALKER 256.**

Tese apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Doutor em Biologia
Celular e Molecular, Programa de Pós-
Graduação em Biologia Celular e Molecular,
Setor de Ciências Biológicas, Universidade
Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes

CURITIBA

2005

TERMO DE APROVAÇÃO

NATHALIA MARCOLINI PELUCIO PIZATO

EFEITO DA DIETA COM DIFERENTES PROPORÇÕES DE ÁCIDOS GRAXOS N-6:N-3 SOBRE O CRESCIMENTO TUMORAL, CAQUEXIA E SISTEMA IMUNITÁRIO EM RATOS PORTADORES DO TUMOR DE WALKER 256.

**Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora no
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências
Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:**

Orientador: Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes
Departamento de Fisiologia, UFPR

Prof. Dr. Paulo Ivo Homem de Bittencourt Jr.
Departamento de Fisiologia, UFRGS

Prof. Dr. João Repcka
Hospital Angelina Caron

Profa. Dra. Anita Nishiyama
Departamento de Fisiologia, UFPR

Prof. Dr. Silvio Zanatta
Departamento de Patologia, UFPR

Curitiba, 31 de janeiro de 2005

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
CELULAR E MOLECULAR**

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia

Setor de Ciências Biológicas

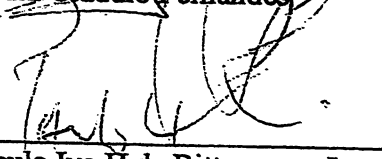
Universidade Federal do Paraná


Instituto de Biologia Molecular do Paraná


PARECER

A Comissão Examinadora de Defesa de Tese de Doutorado “EFEITO DA DIETA COM DIFERENTES PROPORÇÕES DE ÁCIDOS GRAXOS N-6:N-3 SOBRE O CRESCIMENTO TUMORAL, CAQUEXIA E SISTEMA IMUNITÁRIO EM RATOS PORTADORES DO TUMOR DE WALKER 256”, de autoria da doutoranda **Nathalia Marcolini Pelucio Pizato**, e com a Banca Examinadora de Defesa de Tese de Doutorado constituída pelos Professores: Dr. Luiz Cláudio Fernandes (Orientador e Presidente da UFPR); Dr. Paulo Ivo Homem de Bittencourt Jr. (UFRGS); Dr. João Repcka (Hospital Angelina Caron); Dr^a. Anita Nishiyama (UFPR) e Dr. Silvio Marques Zanata (UFPR). Segundo a avaliação da Banca Examinadora de Defesa de Tese de Doutorado, a candidata foi: APROVADA. Para a devida publicação o trabalho deve sofrer as modificações sugeridas. Em Curitiba, 31 de janeiro de 2005.


Dr. Luiz Cláudio Fernandes


Dr. Paulo Ivo H de Bittencourt Jr.


Dr^a. Anita Nishiyama


Dr. João Repcka


Dr. Silvio Marques Zanata

CENTRO POLITÉCNICO – CEP 81.531-990-JARDIM DAS AMÉRICAS-Caixa Postal 19031-FONE: (41) 361-1676 FAX 266-2042 – E-Mail: politecnico@ufpr.br – CURITIBA - PARANÁ





Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEa)



Nº 005

CERTIFICADO

A Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEa) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituída pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento da CEEa, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no PROJETO DE PESQUISA abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

Processo: 23075.36616/2003-01 - Data da aprovação: 09/09/2003

Título: Efeito da dieta com diferentes razões de ácidos graxos N-3:N-6 sobre o crescimento tumoral e sistema imunitário em ratos portadores de tumor de Walker 256

Autores: Luiz Cláudio Fernandes (resp.) Nathalia Marcolini Pelucio Pizato

Em Curitiba, 09 de Setembro de 2003.

Prof. SILVIO MARQUES ZANATA
Secretário

Profa. ANETE CURTE FERRAZ
Presidente

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos pais, Wilson e Clélia, e meu irmão, Octávio, pelo apoio e incentivo incondicional nesta etapa importante de minha vida.

Ao meu marido, Arthur, pelo carinho, paciência e auxílio nas correções da tese.

Ao meu amigo e orientador Luiz Cláudio, pela sabedoria e ensinamentos durante o desenvolvimento da tese e por me ensinar, de verdade, a trabalhar em grupo.

Aos meus amigos do laboratório, Ricardo K., Júlia, Claudinha, Rogéria, Everson, João, Sandro, Ricardo T, Maurício, Maressa, Evelise, Rodrigo, Loli, e a todos que ajudaram para a realização deste trabalho.

Aos bioteristas, Luizão, Cândido, Dona Tereza, Iséli e Márcia, pelo auxílio no cuidado dos animais.

Aos professores do Departamento de Fisiologia e Biologia Celular.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	ix
RESUMO.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 OS ÁCIDOS GRAXOS ESSENCIAIS E A ALIMENTAÇÃO.....	1
1.2 METABOLISMO DOS ÁCIDOS GRAXOS ESSENCIAIS E SUA RELAÇÃO COM PROCESSOS NEOPLÁSICOS.....	3
1.3 OS ÁCIDOS GRAXOS E A CAQUEXIA NO CÂNCER.....	6
1.4 ÁCIDOS GRAXOS E O SISTEMA IMUNITÁRIO.....	11
2. OBJETIVOS.....	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1 ANIMAIS.....	18
3.2 REAGENTES E ENZIMAS.....	18
3.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	18
3.4 OBTENÇÃO E TRANSPLANTE DAS CÉLULAS DO TUMOR DE WALKER 256.....	19
3.5 PREPARO DAS RAÇÕES.....	19
3.6 DETERMINAÇÃO DO PESO DOS TECIDOS E DOS RATOS.....	22
3.7 DETERMINAÇÃO DA INGESTÃO ALIMENTAR.....	22
3.8 DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS NO SANGUE.....	22
3.8.1 GLICEMIA.....	22
3.8.2 LACTATO SÉRICO.....	22
3.9 DETERMINAÇÃO DO PERFIL LIPÍDICO NO SORO.....	24
3.9.1 COLESTEROL.....	24
3.9.2 TRIACILGLICERÓL.....	24
3.9.3 COLESTEROL HDL.....	24
3.10 PEROXIDAÇÃO PELO MÉTODO HIDROPERÓXIDO.....	25
3.11 OBTENÇÃO DAS CÉLULAS DO SISTEMA IMUNITÁRIO.....	25
3.11.1 OBTENÇÃO DOS LINFÓCITOS.....	25
3.11.2 CULTIVO CELULAR.....	26
3.11.3 ANÁLISE DE MARCADORES DE SUPERFÍCIE.....	26
3.12 OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS.....	27
3.12.1 PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO.....	27
3.12.2 MENSURAÇÃO DO ÂNION SUPERÓXIDO.....	27
3.12.3 QUANTIFICAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO.....	28
3.13 QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS.....	28
3.14 EXTRAÇÃO LIPÍDICA E DETERMINAÇÃO DO PERFIL LIPÍDICO POR CROMATOGRAFIA A GAS (GC).....	29
3.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
4. RESULTADOS.....	30
4.1 EVOLUÇÃO DA MASSA CORPÓREA PRÉ-TUMOR.....	30
4.1.2 PESO DO TUMOR EM PERCENTAGEM À DO PESO CORPÓREO.....	31
4.2. RESULTADOS DOS PARÂMETROS DE CAQUEXIA.....	32
4.2. PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DE CAQUEXIA.....	34
4.2. RESULTADOS DOS PARÂMETROS IMUNITÁRIOS.....	39
4.2.2 Proliferação dos linfócitos.....	40
4.2.3 Marcadores de superfície (CD4 ⁺ e CD8 ⁺).....	46
4.2.4 Produção das espécies reativas de oxigênio.....	52

5. DISCUSSÃO.....	55
6. CONCLUSÃO	72
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidônico
AG n-3	Ácidos graxo n-3
AG n-6	Ácidos graxos n-6
AL	Ácido linoléico
ALA	Ácido alfa-linoléico
APM _C	Adenosina monofosfato ciclica
ATP	Adenosina trifosfato
CO ₂	Gás carbônico
ConA-	Concanavalina A
COX	Enzima cicloxigenase
CPM	Contagem por minuto
DHA	Ácido docosaheptaenóico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade ótica
EPA	Ácido eicosapentaenóico
GC	Cromatografia gasosa
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HETE	Ácidos hidroxieicosatetraenóico
HPETE	Ácidos hidroxiperoxieicosatetraenóico
IFN _γ	Interferon gama
IL-1	Interleucina tipo 1
IL-2	Interleucina tipo 2
IL-6	Interleucina tipo 6
INCA	Instituto nacional do câncer
IP ₃	Inositol trifosfato
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LMF	Fator mobilizador de lipídeos
LOX	Enzima lipoxigenase
LPL	Lípase lipoprotéica

LPS	Lipopolissacarídeo bacteriano
LTB ₄	Leucotrieno serie B ₄
LTB ₅	Leucotrieno serie B ₅
LT _s	Leucotrienos
LX	Lipoxinas
MHC	Complexo de histocompatibilidade
MMP-2	Metaloproteases de matriz tipo 2
MMP-9	Metaloproteases de matriz tipo 9
MNC	mononucleares
NK	Linfócitos natural killer
NO	Óxido nítrico
O ₂	Oxigênio
PBS	Solução tampão de fosfato
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PGE ₂	Prostaglandina serie E ₂
PG _s	Prostaglandinas
PIF	Fator indutor de proteólise
PUFA	Ácido graxo poliinsaturado
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
ROS	Espécies reativas de oxigênio
TGF-β	Fator transformante de crescimento β
Th1	Linfócito T helper 1
Th2	Linfócito T helper 2
TNF _α	Fator de necrose tumoral alfa
TX _s	Tromboxanas
VEGF	Fator de crescimento endotelial de vasos
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
W	Animais portadores de tumor

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

GRAFICOS	TÍTULO	PAGINA
Gráfico 1	Evolução da dieta na sociedade.....	2
Gráfico 2	Metabolismo dos ácidos graxos	5
Gráfico 3	Proliferação de linfócitos tratados com diferentes dietas.....	13
QUADRO		
Quadro 1	Composição das dietas.....	20
TABELAS		
Tabela 1	Análise da composição das rações.....	21
Tabela 2	Análise dos ácidos graxos das rações.....	21
Tabela 3	Peso corpóreo, peso tumoral, peso carcaça e perda de peso...	33
Tabela 4	Proliferação timo.....	40
Tabela 5	Proliferação timo com tumor.....	40
Tabela 6	Proliferação baço.....	42
Tabela 7	Proliferação baço com tumor.....	42
Tabela 8	Proliferação linfonodo.....	44
Tabela 9	Proliferação linfonodo com tumor.....	44
Tabela 10	Óxido nítrico.....	54
FIGURAS		
Figura 1	Peso corpóreo dos animais.....	30
Figura 2	Peso do tumor.....	31
Figura 3	Ingestão alimentar.....	32
Figura 4	Glicemia	34
Figura 5	Lactacidemia.....	35
Figura 6	Triacilgliceróis.....	36
Figura 7	Colesterol total	37

Figura 8	Colesterol HDL.....	38
Figura 9	Peroxidação lipídica do tecido tumoral	38
Figura 10	Peso baço.....	39
Figura 11	População CD4 ⁺ timo.....	46
Figura 12	População CD4 ⁺ timo com tumor.....	47
Figura 13	População CD4 ⁺ linfonodo.....	47
Figura 14	População CD4 ⁺ linfonodo com tumor.....	48
Figura 15	População CD8 ⁺ timo.....	49
Figura 16	População CD8 ⁺ timo com tumor.....	49
Figura 17	População CD8 ⁺ linfonodo.....	50
Figura 18	População CD8 ⁺ linfonodo com tumor.....	51
Figura 19	Anion superóxido.....	52
Figura 20	Peróxido de hidrogênio.....	53

RESUMO

A nutrição é fator ambiental que sofreu alterações importantes durante os últimos dez mil anos. Achados arqueológicos e estudos sobre a evolução da dieta humana, a partir da era Paleolítica, sugerem que as principais alterações na dieta ocorreram nos níveis de lipídios consumidos, particularmente no tipo e na quantidade de ácidos graxos consumidos. Associado a essas alterações, tem-se estudado o aumento da prevalência das doenças crônico-degenerativas como o câncer em populações com consumo alto de lipídeos. Visto que os ácidos graxos poliinsaturados interferem nas alterações metabólicas durante a síndrome da caquexia e sobre o sistema imunitário em modelos experimentais e em pacientes portadores de diferentes tipos de câncer, este trabalho tem como objetivo investigar o quadro de caquexia e o perfil da resposta imunitária em ratos tratados com dietas que apresentam diferentes razões de ácidos graxos N6 para N3 mediante a presença do tumor de Walker 256. Os animais, após o desmame (21 dias), foram separados nos seguintes grupos de acordo como tipo de dieta oferecida grupo N3 (N3), grupo N6 (N6), grupo razão N3:N6 de 1:6 (R6), razão 1:30 (R30) e razão 1:60 (R60). Estes grupos receberam suas respectivas rações até completarem 70 dias, e então metade do grupo foi inoculado com 1 mL subcutaneamente, no flanco direito, de suspensão de células do tumor de Walker 256, contendo 2×10^7 células/mL. Na outra metade do grupo foi inoculado salina 0,9%, formando dois grupos para cada dieta, um grupo sem tumor e outro portador de tumor de Walker (representados pela letra W). Os animais foram sacrificados ao 14º dia após a inoculação do tumor, e foram feitas análises bioquímicas e imunológicas. Foi concluído que a suplementação com a ração com proporção de ácidos graxos N3: N6 de R6 ao longo da vida é protetora para crescimento tumoral, reduz a caquexia e a anorexia, a ativação dos linfócitos do timo, baço e linfonodo mesentérico, mantém as concentrações de $CD4^+$ e $CD8^+$ e aumenta a produção de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico pelos macrófagos em ratos portadores de tumor de Walker 256.

1. INTRODUÇÃO

1.1 OS ÁCIDOS GRAXOS ESSENCIAIS E A ALIMENTAÇÃO.

A interação entre genética e meio ambiente, natureza e nutrientes é fundamental para a manutenção da saúde ou para o desenvolvimento da doença. Nesta última década, utilizando-se técnicas de biologia molecular, foi possível demonstrar que fatores genéticos determinam suscetibilidade para doenças e que fatores ambientais determinam quais indivíduos geneticamente suscetíveis serão afetados (SIMOPOULOS, 1999a).

A nutrição é fator ambiental muito importante, e ela sofreu alterações importantes durante os últimos dez mil anos. É estimado que as mutações espontâneas que ocorrem no DNA aconteçam numa frequência de 0,5% a cada milhão de anos, ou seja, nos últimos dez mil anos, onde formou-se cerca de 500 gerações, esta taxa estaria em torno de 0,005%, o que em termos de genética significa pouca ou nenhuma alteração (EATON & KONNER, 1985). Isso quer dizer que nossos genes são iguais aos genes de nossos ancestrais que viveram de dez a quarenta mil anos atrás, apesar dos humanos viverem hoje em um ambiente nutricional que é totalmente diferente daquele que nossa constituição genética foi estabelecida (SIMOPOULOS, 1999b).

Achados arqueológicos e estudos sobre a evolução da dieta humana, a partir da era Paleolítica, sugerem que as principais alterações na dieta ocorreram nos níveis de lipídios consumidos, particularmente no tipo e na quantidade de ácidos graxos consumidos. A dieta de nossos ancestrais apresentava menor quantidade de gorduras saturadas, ingestão de razão balanceada de ácidos graxos essenciais n-3: n-6 (N3:N6), pequeno consumo de ácidos graxos trans, grande consumo de vegetais e frutas com alto teor de vitamina C e E (SIMOPOULOS, 1999a; WILLET, 2003). Nos últimos cento e cinquenta anos, a partir da revolução industrial, houve grande alteração na ingestão de gorduras (gráfico 1), tanto na quantidade quanto nas proporções consumidas de ácidos graxos. Associado a essas alterações, o aumento da prevalência das doenças crônico-degenerativas tais como diabetes, hipertensão arterial, aterosclerose, obesidade e câncer. Em adição a dieta, também ocorreram alterações no hábito de vida das pessoas como por exemplo, aumento do sedentarismo e a exposição crônica a substâncias nocivas

interagem com processos bioquímicos, que são controlados geneticamente, que levam a formação das doenças crônicas (LEONARD, 2002).

Em resumo, nas dietas ocidentais o perfil de consumo de lipídios atinge 40% do valor calórico total ingerido, grande ingestão de ácidos graxos saturados e do tipo trans, e desproporção na ingestão de ácidos graxos essenciais. Quanto a razão n-3:n-6, a proporção de consumo na era Paleolítica destes ácidos graxos era em torno de 1:1-2 e hoje encontra-se na faixa de 1:15-20 (SIMOPOULOS, 1999a).

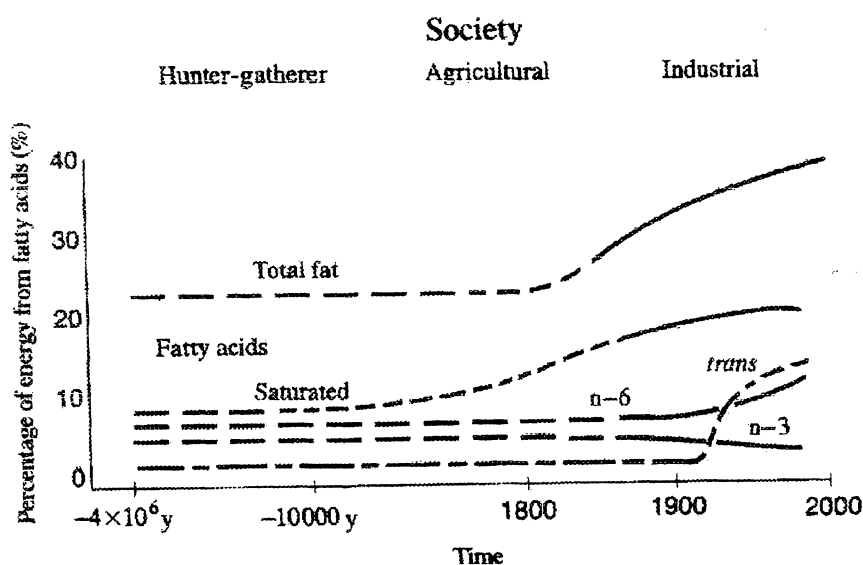


Gráfico 1. Percentual relativo de gordura e de diferentes famílias de ácidos graxos na nutrição humana, extrapolado a partir de análise de seção-cruzada, da sociedade de caçadores até a industrial. (SIMOPOULOS, 1999a).

Alguns trabalhos tem demonstrado relação entre o alto consumo de gordura e a incidência de câncer. SLATTERY (1997) mostrou que a razão de n3:n6 na gordura corporal está relacionada com a incidência de câncer, onde razões elevadas são estimuladoras enquanto as baixas razões protegem do crescimento de tumores. CAPONE e cols., (1997) relacionou maior incidência e mortalidade por câncer de mama em mulheres que consomem dieta ocidental, do que mulheres japonesas que consomem dietas pobres em gordura, cerca de 10-20% do total de calorias ingeridas. Dietas ricas em ácidos graxos N6 podem servir como substratos para a peroxidação lipídica e formação

de radicais livres podendo ter efeito a longo-prazo na carcinogênese (NIXON 1996; SLATERRY 1997; CAPONE e cols., 1997). Alguns autores têm defendido a razão 1:4 de ácidos graxos N3 para N6 para uma melhor conversão em seus derivados metabólicos, os ácidos graxos de cadeia longa (SIMOPOULOS, 1999b; CALDER, 2001a). Estudo feito por INDU e GHAFOORUNISSA (1992) demonstrou que enquanto mantendo a quantidade de ácido linoléico (AL - 18:2 n-6) constante, o uso de 3.7g de ácido alfa-linolênico (ALA - 18:3 n-3) foi o que apresentou melhor conversão ALA em ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) N3. Assim, a razão 1:4 (15g AL : 3.7g de ALA) é apropriado para esta conversão.

A razão n-6:n-3 presente na alimentação atual leva a maiores riscos do desenvolvimento de doenças crônico-degenerativas. Enquanto populações como a de esquimós, que consomem alimentos ricos em ácidos graxos N3, (consumo dietético na razão n-6:n-3 de 1:1) a mortalidade por doenças cardiovasculares é de 7%. Já nos países do norte europeu e nos Estados Unidos que consomem a dieta ocidental, onde a razão está em 45:50:1, a mortalidade por doenças cardiovasculares chega a 45% e a prevalência de diabetes tipo 2 é diretamente proporcional ao aumento na razão n-6:n-3. (SIMOPOULOS, 1999b). A importância da manutenção da razão n-6:n-3, ao invés de suas concentrações absolutas no plasma, é devida aos produtos sintetizados a partir destes ácidos graxos, os eicosanóides. Isto ocorre devido à competição entre os ácidos graxos n-6 e n-3 por enzimas como as elongases e as desaturases (ROSE & CONOLLY, 1999). A metabolização ocorre através da adição de átomos de carbono na cadeia dos ácidos graxos, e o aumento do número de duplas ligações na cadeia, respectivamente, devido as elongases e desaturases (JIANG e cols., 1998).

1.2 METABOLISMO DOS ÁCIDOS GRAXOS ESSENCIAIS E SUA RELAÇÃO COM PROCESSOS NEOPLÁSICOS.

Os ácidos graxos N3 e N6 são metabolizados formando ácidos graxos de cadeia longa como o ácido eicosapentaenóico (EPA), docosahexaenóico (DHA) e o ácido araquidônico (AA), respectivamente. A partir do EPA, DHA e AA as enzimas ciclooxigenase (COX) e lipooxigenase (LOX) sintetizam os eicosanóides (ARONSON, 2001), que incluem, principalmente, prostaglandinas (PGs), tromboxanas (TXs) e leucotrienos (LTs), onde cada família de ácidos graxos irá derivar diferentes classes de

eicosanóides (gráfico 2). Os ácidos graxos N6, uma vez convertidos em AA, resultam na formação de prostaglandinas e tromboxanas da série 2 (PG₂ e TB₂) e leucotrienos da série 4 (LT₄) (CAPONE e cols., 1997; JIANG e cols., 1998). Estes eicosanóides apresentam papéis importantes na regulação da inflamação, imunidade, migração celular e plaquetária, pressão arterial e função na musculatura e vasos de tecidos lisos, com ações proinflamatórias que incluem febre e eritema, aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação, causando dor e edema (CALDER, 1997b), formação de trombos e ateroma e aumento da proliferação celular (SIMOPOULOS, 1999a).

O ácido eicosapentaenóico (EPA- 20:5 n-3) e o ácido docosahexaenóico (DHA- 22:6 n-3) levam a síntese de prostaglandinas e tromboxanos da série 3 (PG₃ e TB₃) e leucotrienos da série 5 (LT₅), que apresentam efeitos biológicos menos potentes do que os eicosanóides sintetizados a partir dos ácidos graxos N6 (CAPONE e cols., 1997; CALDER, 1997a). Também estão associados com redução na síntese de metabólitos derivados das PG₂ e TB₂, potentes agregadores plaquetários e vasoconstritores, redução na formação de LT₄, indutor de inflamação, quimiotaxia e adesão de leucócitos, aumento na síntese de TBA₃, que apresenta ação fraca na agregação plaquetária e vasoconstritora, e aumento da síntese de LTB₅, também com ação fraca como indutor de inflamação e como agente quimiotático (figura 2) (SIMOPOULOS, 1999a). Os eicosanóides produzidos a partir do EPA são menos ativos biologicamente do que seus análogos sintetizados a partir do AA, por exemplo, LTB₅ é dez vezes menos potente do que LTB₄ como agente quimiotático para neutrófilos, e PGE₃ é menos pró-inflamatória do que PGE₂ (ALEXANDER, 1998; CALDER, 2001c).

Devido ao aumento no consumo de ácidos graxos N6 na dieta ocidental, os eicosanóides produzidos a partir do AA, são formados em maior quantidade do que os eicosanóides formados a partir dos ácidos graxos N3, principalmente o EPA (NIXON 1996; SLATTERY 1997; CAPONE e cols., 1997; JIANG e cols., 1998; SIMOPOULOS 1999a; ROSE & CONOLLY 1999; ARONSON, 2001). Então, uma dieta rica em ácidos graxos N6 leva a um estado fisiológico prótrombótico e próagregador, com aumento na viscosidade sangüínea, vasoespasmos, vasoconstrição (SIMOPOULOS, 1999b), além de promover o câncer através de estímulos em vários estágios no desenvolvimento de câncer de cólon e mama (KROMHOUT, 1990; JIANG e cols., 1998). A prostaglandina E₂ aumenta significativamente os níveis de AMPc e de cálcio intracelulares, o que são

eventos primários para a ativação das células T, envolvidas no processo inflamatório (ALEXANDER, 1998).

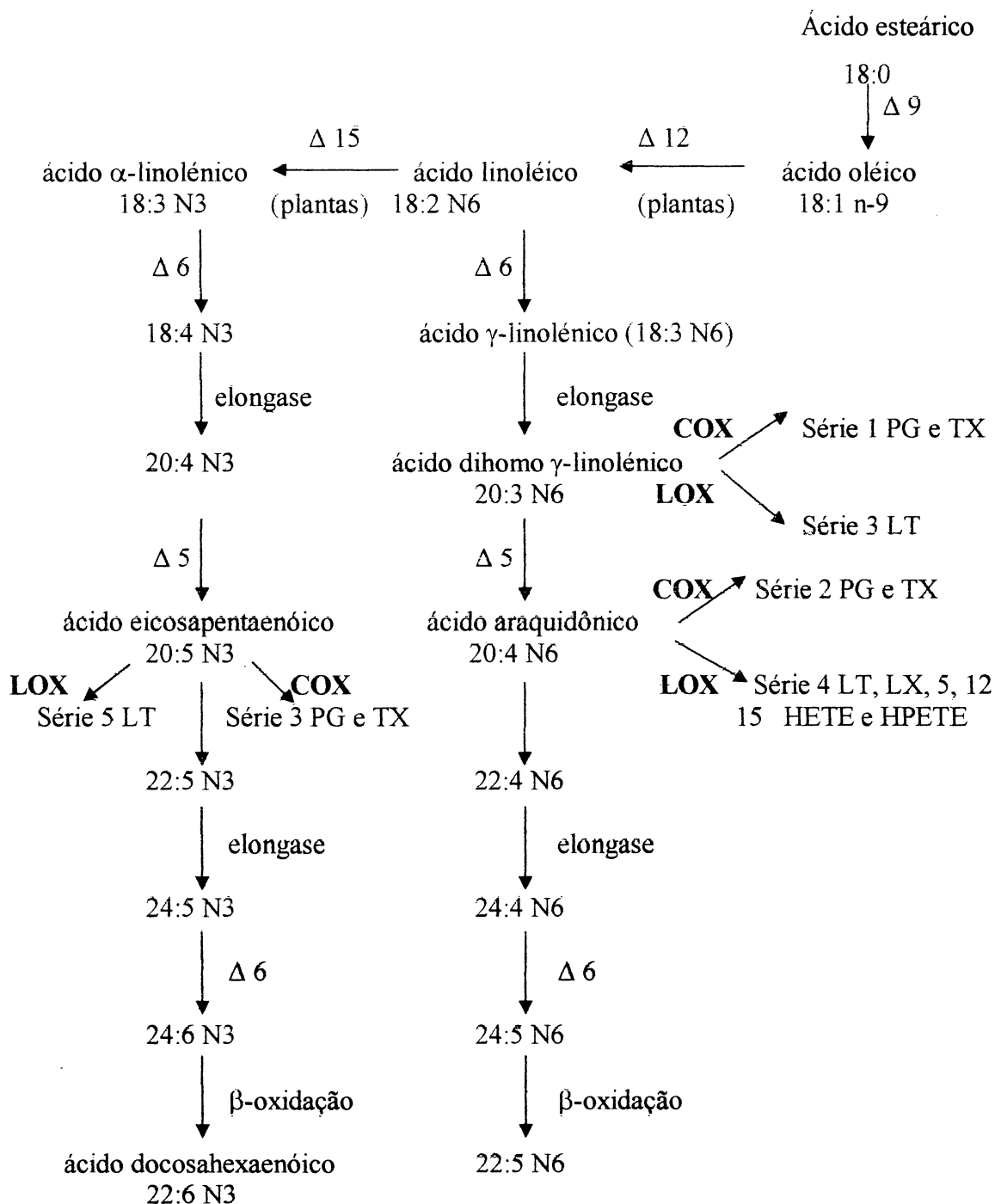


Gráfico 2: Metabolismo dos ácidos graxos poliinsaturados. Enzimas dessaturases $\Delta 5$, $\Delta 6$, $\Delta 9$, $\Delta 12$ e $\Delta 15$; COX: ciclooxigenase; LOX: enzima lipooxigenase; PG: prostaglandinas; LT: leucotrienos; TX: tromboxanas; LX: lipoxinas; HETE: ácidos hidroxi-eicosatetraenóico; HPETE: ácidos hidroxiperoxi-eicosatetraenóico. Adaptado de CALDER, 2001b.

Dietas enriquecidas com ácido linoléico (30-40%), quando comparadas com dietas controle, contendo 15% de ácido linoléico, falharam em promover maior tumorigênese do que as controles, indicando que nas dietas controles (que contém percentual de ácido linoléico semelhante à dieta ocidental) os níveis de eicosanóides e de AA nos tecidos já são suficientes para o crescimento tumoral, e que o aumento nos componentes para a cascata do AA não aumenta significativamente a tumorigênese (McENTEE & WHELAN, 2002). Em contraste, os ácidos graxos N3 parecem evitar o câncer por influenciar na atividade de enzimas e proteínas relacionadas à sinalização intracelular e proliferação celular (CALDER, 2001a) e conseguir diminuir e estabilizar a perda de peso em pacientes com câncer de pâncreas (BOUDREAUS e cols., 1991; TASHIRO, 1998; BARBER 1999b).

A peroxidação lipídica também parece ser um dos mecanismos pelos quais os ácidos graxos N3 exercem sua ação antitumorigênica (ROSE & CONNOLY, 1999; CALDER, 2001a; TAPIERO, 2002). A oxidação lipídica das membranas celulares, processo mediado por radicais livres, é importante na manutenção da sobrevivência das células tumorais. Os radicais livres atacam os lipídios de membrana, principalmente nas duplas ligações de seus carbonos, desintegrando a membrana celular e impedindo sua sobrevivência. A incorporação dos ácidos graxos N3 de cadeia longa na membranas das células do tumor facilitam a peroxidação dos lipídios de membrana, e consequentemente, redução do crescimento tumoral (BABA e cols., 2000).

1.3 OS ÁCIDOS GRAXOS E A CAQUEXIA NO CÂNCER.

No Brasil, segundo relatório de 2004 do Instituto Nacional do Câncer (INCA), serão registrados 430 mil novos casos de câncer, sendo os mais comuns os de pele (não melanoma), seguido pelo câncer de mama, próstata, pulmão e estômago. O câncer representa uma das principais causas de mortalidade no nosso país, aproximadamente 200 mil indivíduos irão a óbito em 2005.

Pacientes com câncer frequentemente exibem a síndrome da caquexia (do grego kakos = ruim, mal; hexis = condição). Esta síndrome é um problema metabólico complexo, comum nos pacientes portadores de câncer, e está associada a diversas

manifestações como perda de peso com depleção severa de musculatura esquelética e tecido adiposo (TISDALE, 1996), alterações nos níveis de lipídios séricos, paladar, saciedade precoce, anemia, edema, aumento do gasto energético, aumento na síntese de proteínas hepáticas de fase aguda, menor tempo de sobrevivência e piora na qualidade de vida dos pacientes (WIGMORE, 1996; TISDALE 1997; BARBER 2001). Estas alterações nem sempre são explicadas pela anorexia acompanhante do quadro e, suplementações nutricionais sozinhas não reverterem o quadro de caquexia (TISDALE, 1997).

Diferentes citocinas pró-inflamatórias parecem estar envolvidas na caquexia, como o fator de necrose tumoral (TNF), interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6), e interferon gama (IFN γ). A presença dessas citocinas levam a anorexia, perda de peso, alterações no metabolismo de lipídios, por suprimirem a atividade da enzima lipase lipoprotéica (LPL) favorecendo a lipólise, aumentam o turnover de proteínas, os níveis de cortisol, glucagon e adrenalina (hormônios catabólicos), reduzem os níveis de insulina (hormônio anabólico) e favorecem o quadro de resistência periférica à insulina, aumentam a resposta das proteínas de fase aguda, tanto em modelos animais quanto em estudos em humanos (TISDALE 1997; BARBER e cols., 1999a; DUNLOP & CAMPBELL, 2000; BARBER 2001).

Além de fatores humorais relacionados a caquexia, são encontrados fatores derivados dos tumores que também estariam envolvidos no processo caquético. Diferente das citocinas, estes componentes são conhecidos como fator indutor de proteólise (PIF) e fator mobilizador de lipólise (LMF) (TISDALE, 1997). Estes fatores induzem diretamente a proteólise e a lipólise, não somente in vivo mas também em preparações isoladas de músculo, e o PIF parece ter efeito direto na inibição da captação de glicose pelo músculo esquelético (ARGILÉS e cols., 2003).

Em relação a perda muscular durante a caquexia, é sugerido que a massa muscular diminui como resultado da menor taxa de síntese protéica, enquanto que alterações na degradação das proteínas seriam uma causa secundária. Tisdale (2000) mostrou que a síntese de proteínas em indivíduos saudáveis está em torno de 53%, enquanto que em indivíduos caquéticos é em torno de 8%. Argilés e colaboradores (2003) demonstraram que a síntese do aminoácido 3-metilhistidina, um marcador de degradação

proteína miofibrilar, está aumentada drasticamente na musculatura esquelética durante o crescimento tumoral e que também há grande aumento na degradação de proteína em estudos *in vivo* e *in vitro*, sendo que este mecanismo é ativado pela presença de TNF Carbó e colaboradores (2002) mostraram que associado a perda muscular, também ocorre perda de DNA das células musculares durante a caquexia, por apoptose. Então, a degradação das proteínas musculares e a apoptose do DNA são importantes fatores metabólicos, possivelmente envolvidos na perda muscular de portadores de tumor.

No tecido adiposo, a síndrome da caquexia leva a alterações no metabolismo de lipídios e do colesterol, com redução da massa de tecido adiposo, aumento de ácidos graxos livres e triacilgliceróis no plasma, e redução os níveis de HDL e colesterol total. Esta hiperlipidemia encontrada tanto em humanos quanto em modelos animais experimentais está associada com a produção de fatores catalíticos do próprio tumor (LMF) e pela redução da atividade da enzima LPL (lipoproteína lipase), responsável pelo armazenamento dos ácidos graxos no tecido adiposo (TISDALE, 1997; COSTELLI e colaboradores 1999). O LMF parece agir diretamente no tecido adiposo na liberação de ácidos graxos e glicerol através do aumento do AMPc intracelular de maneira semelhante à lipase hormônio sensível, enquanto as citocinas produzidas pelos linfócitos e pelo próprio tumor agem reduzindo a LPL, resultando em aumento do fluxo de lipídios na circulação (TISDALE, 2001).

Como existem cerca de 400 diagnósticos histológicos descritos para os diferentes cânceres (DUNLOP & CAMPBELL, 2000), a frequência da perda de peso pode variar de acordo com o tipo de tumor, sendo de 30% em pacientes com diagnóstico favorável de linfoma de Hodgkin para cerca de 90% em pacientes com câncer gástrico ou pancreático (TISDALE, 1996). A caquexia é a causa de 20% das mortes em pacientes com câncer de pâncreas (BARBER, 1999b), e pode contribuir para mortes por outras causas tais como infecções, cirurgias de grande porte, queimaduras e politraumas (TISDALE, 1997).

Algumas teorias sugerem competição entre o tumor e o hospedeiro por nutrientes, conforme a progressão do tumor às custas do hospedeiro. TISDALE (2000) mostrou que ao transplantar adenocarcinoma de cólon MAC16 de rato, em camundongos, a perda de peso foi proporcional ao tamanho do tumor e ocorreu sem redução da ingestão calórica. Entretanto, em outro trabalho, o mesmo autor demonstrou que alguns pacientes com

grandes tumores, não apresentaram sinais de caquexia, enquanto em outros, a caquexia estava presente mesmo com o tumor representando 0,01% do peso corporal (TISDALE, 2001), demonstrando que as alterações metabólicas induzidas pela caquexia dependem do tipo de câncer presente nos pacientes.

Algumas anormalidades neuroendócrinas são observadas em pacientes caquéticos portadores de tumor. O aumento na atividade serotoninérgica no sistema nervoso central como resultado do aumento da disponibilidade do seu precursor triptofano, tem sido utilizado como hipótese para desencadear o início da síndrome da caquexia (GIACOSA, 1996). Kitchener e Dourish (1994) sugeriram que a ativação dos receptores 5HT-_{1B} e 5HT-_{1C} podem estar associados à indução no aumento da saciedade em ratos e que o receptor 5HT₂ reduz a sensação de fome. O bloqueio do receptor 5HT₃ também parece melhorar a sensação de fome em pacientes portadores de câncer (EDELMAN, 1999). Outros fatores neurológicos e neuropsiquiátricos também manifestam-se nesta síndrome como dor, depressão, ansiedade, saciedade precoce e aversão a alimentos e aromas (PLATA-SALAMÁN, 2000).

As alterações no metabolismo da glicose, mais freqüentemente presentes em pacientes com câncer, são a hipoglicemia e a hiperlaticidemia (TISDALE, 1996). A glicose é convertida em lactato no metabolismo anaeróbio, mas em condições catabólicas pode ocorrer a conversão de lactato em glicose pelo fígado por gliconeogênese, processo conhecido como ciclo de Cori (DUNLOP & CAMPBELL, 2000). Em pessoas saudáveis, este ciclo corresponde a 20% da produção de glicose, mas em pacientes caquéticos este percentual pode chegar a 50%, sendo que o tumor é responsável pela produção de pelo menos 60% do lactato circulante, uma vez que suas mitocôndrias tem dificuldade em realizar glicólise aeróbia (TISDALE, 2000). Também ocorre uma grande aumento na gliconeogênese a partir de alanina (proveniente da proteólise) e de glicerol (proveniente da lipólise) (BARBER, 1999a). São produzidos 2 moléculas de ATP pela quebra da glicose em lactato durante a glicólise, na gliconeogênese a partir do lactato são gastos 6 moléculas de ATP para cada ciclo lactato-glicose, sendo este processo energeticamente ineficiente para o portador de tumor. A produção de glicose pelo fígado em indivíduos caquéticos está aumentada em 40%, enquanto que pacientes que sofrem de anorexia nervosa apresentam redução na sua produção (TISDALE, 2001). Essas alterações no

metabolismo da glicose auxiliam no desenvolvimento da caquexia, uma vez que o gasto energético basal está aumentado e a anorexia esta quase sempre presente em pacientes caquéticos, reduzindo seu consumo alimentar.

KARMALI (1996) mostrou que os ácidos graxos poliinsaturados apresentavam efeitos sob o crescimento tumoral em diferentes modelos experimentais de tumor, onde os eicosanóides derivados dos ácidos graxos N6 (AG N6) promoviam efeito maior na carcinogênese, proliferação e diferenciação celular, metástases, e caquexia do que os ácidos graxos N3 (AG N3). Foram estudadas diferentes linhagens de tumores (modelos de tumor mamário R3230AC e DMBA, carcinoma metastizante de mama 1376MAT:B, e tumor de próstata DU-145 e significante inibição do desenvolvimento e/ou progressão de cada um dos modelos estudados foi observado pela administração de AG N3 quando comparado com a de AG N6.

YANG (1999) demonstrou a relação entre o consumo de gorduras e o desenvolvimento de doenças prostáticas, como o câncer de próstata, onde coletaram amostras de sangue de pacientes controles, portadores de hiperplasia prostática benigna e com câncer de próstata. Os pacientes portadores do câncer apresentavam maiores níveis de AG N6, menores níveis de AG N3 e menor razão N3:N6 do que os dos outros grupos. TERRY (2001) e colaboradores em estudo epidemiológico de 30 anos mostraram que homens com baixo consumo de peixes, fonte de AG N3, apresentavam um risco três vezes maior de desenvolver câncer de próstata. Isto sugere que os AG N6 estariam envolvidos com efeitos promotores, enquanto os AG N3 com efeitos antipromotores na proliferação celular no câncer. Alguns autores mostram que os AG N3 estariam envolvidos na produção e no efeito biológico das citocinas (MEYDANI 1996, ALEXANDER 1998, De PABLO e cols., 2000). As citocinas são moléculas protéicas secretadas por tipos celulares específicos em resposta a estímulos individuais, que podem ser sintetizadas pelas células do hospedeiro ou do próprio tumor (TISDALE, 1997). Estas moléculas não parecem agir de forma individual, mas sim em combinação com outros fatores resultando em uma resposta complexa (BARBER 2001). A produção de citocinas pelo cérebro, mediante o estímulo pela presença de um tumor periférico, principalmente no hipotálamo e córtex cerebral, pode estar envolvida nas manifestações

neuropsiquiátricas e dar início às manifestações metabólicas presentes na síndrome da caquexia (PLATA-SALMÁN, 2000).

Alguns estudos mostraram que doses diárias entre 2 a 6 g de AG N3 apresentam efeitos antiinflamatórios por reduzirem a produção de citocinas pró-inflamatórias em voluntários saudáveis e em pacientes portadores de câncer de pâncreas (BARBER 1999a e 2001). Esses efeitos podem estar associados a uma alteração no balanço da síntese de eicosanóides com ação inflamatória menor e com componentes menos agregadores, provenientes dos AG N3, do que aqueles produzidos pelos AG N6 (CALDER e cols., 1998a).

Em resumo, os danos causados pela caquexia são provavelmente devido as alterações metabólicas presentes nesta síndrome. A suplementação com óleo de peixe afeta alguns dos mediadores envolvidos nessas alterações metabólicas, já que os AG N3 modulam a síntese de citocinas (TASHIRO e cols., 1998), reduzem a síntese de mediadores pró-inflamatórios como as PGE₂ (CAYGILL & HILL, 1995; GOGOS, 1998), aumentam a taxa de peroxidação lipídica (COSTELLI e cols., 1999; BABA e cols., 2000) e inibem a proliferação de células anormais no cólon (precursores de pólipos que podem formar adenomas) em pacientes com risco de câncer de cólon (ANTI, 1994).

1.4 ÁCIDOS GRAXOS E O SISTEMA IMUNITÁRIO.

As funções do sistema imunitário podem ser influenciadas pelo estado nutricional tanto em homens quanto em animais. Os lipídios são componentes essenciais nas dietas, estão diretamente relacionados com o estado nutricional e podem exercer efeitos na modulação do sistema imunitário (De PABLO e cols., 2000).

Os efeitos benéficos dos lipídios presentes na dieta (particularmente os ácidos graxos poliinsaturados) na redução de diversos parâmetros que participam na resposta imunológica, têm sido estudados em animais experimentais e em pacientes que sofrem de

doenças autoimunes e doenças inflamatórias, onde os AG N3 têm promovido redução significativa na inflamação de pacientes portadores de artrite reumatóide, psoríase, lúpus eritematoso sistêmico, esclerose múltipla (De PABLO e cols., 2000), colite ulcerativa, doença de Crohn e na prevenção, reincidência e metástases no câncer (TAPIERO, 2002).

Diferentes estudos têm comparado os efeitos de dietas com alto (40 a 30%) e baixo (20 a 10%) teor de lipídios em animais experimentais, na proliferação de linfócitos. Estes estudos mostram que dietas com alto teor de lipídios resultam em diminuição *ex vivo* da proliferação de linfócitos, quando comparada com dietas com baixo teor de lipídios. A redução no total de gordura dietética ingerida (de 40% para 25% do valor calórico total ingerido) resulta em grande aumento na proliferação de linfócitos humanos do sangue em resposta ao mitógeno Concanavalina A, sugerindo que dietas com alto teor de lipídios modulam a proliferação de linfócitos humanos (CALDER, 2001c). Outro fator importante é o tipo de ácidos graxos usados nos experimentos. Estudos em ratos têm mostrado que o ácido graxo linoléico (AG N6) tem pouco efeito sobre a proliferação de linfócitos T estimulados por Concanavalina A ou fitohemaglutinina (CALDER, 2001b), quando comparada a dietas ricas em ácidos graxos saturados. Em humanos, não foram observadas diferenças significativas na resposta de células T do sangue em voluntários que consumiram dietas ricas (12.9%) ou pobres (3.5%) em AG N6 (JEFFERY, 1996). Outro estudo do mesmo autor mostrou que ratos alimentados com dieta com alto teor de gordura e rica em ácido graxo α -linolénico (AG N3) tem supressão da proliferação de linfócitos T de baço quando comparada com os ratos alimentados com dieta rica em ácido linoléico (JEFFERY, 1997b). WALLACE e cols., (2001) mostraram que a inibição da proliferação de linfócitos T de baço, em camundongos tratados com diferentes dietas, era maior em ratos tratados com óleo de peixe, quando comparada ao óleo de açafrão (rico em AG N6) e óleo de coco (rico em AG saturados) (Figura 3). Na maioria dos estudos *in vitro* há concordância de que a extensão da inibição da proliferação de linfócitos depende do grau de insaturação e do comprimento da cadeia dos ácidos graxos. A ordem aproximada de acordo com a potência de inibição é láurico = mirístico < palmítico < esteárico = oléico < linoléico < linolénico < araquidônico < eicosapentaenóico (CALDER, 1998b).

Os fosfolipídios presentes nos linfócitos de indivíduos que consomem a dieta ocidental e em animais de laboratório que consomem dieta padrão contêm altas

proporções de AG N6. No caso das células mononucleares (MNC - uma proporção de 75:15:10 de uma mistura de linfócitos T, linfócitos B e monócitos) apresentam 6 a 10% de ácido linoléico, 1 a 2% de ácido di-homo- γ -linolénico e 15 a 25% de ácido araquidônico, enquanto as proporções de AG N3 são baixas. A presença de α -linolénico é rara, e EPA e DHA representam 0,1 a 0,8% e 2 a 4 %, respectivamente, com a composição lipídica nas membranas das células do sistema imunitário (CALDER, 2001b).

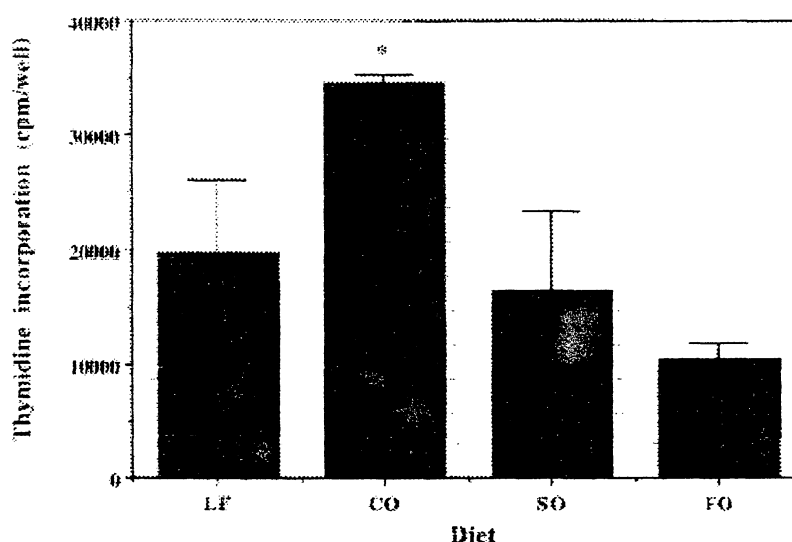


Gráfico 3. Incorporação de ($2 - ^{14}C$) Timidina em linfócitos T de baço em camundongos, mediante diferentes dietas ($p < 0,05$). LF = dieta com baixo teor de gordura; CO = óleo de coco; SO = óleo de açafrão (N6); FO = óleo de peixe (N3) (WALLACE, 2001).

Alterações nos níveis de lipídios nas dietas podem refletir em alterações nos fosfolipídios das células do sistema imunitário, e a alteração na composição destes ácidos graxos parece influenciar a função das MNC. Os possíveis mecanismos seriam: primeiramente, a composição dos fosfolipídios de membrana se alteram de acordo com o padrão de dieta consumida, o que pode modificar características físicas na membrana, como a fluidez da membrana plasmática dos linfócitos ou de regiões da membrana, alterando a habilidade da célula em responder estímulos; segundo, a alteração na síntese de sinalizadores intracelulares formados a partir dos fosfolipídios de membranas, que poderiam reduzir a afinidade de substratos por enzimas que sintetizam moléculas de

sinalização; terceiro, essas moléculas sinalizadoras (as quais incluem prostaglandinas e leucotrienos) são formadas a partir do ácido araquidônico presente na membrana da célula, então reduzindo a concentração sérica deste ácidos graxos, como acontece quando os níveis de ácidos graxos N3 na dieta aumentam, tem sua formação diminuída; quarto, há indícios de que alguns ácidos graxos N3 agem diretamente como moléculas sinalizadoras, influenciando a funcionalidade das células; e finalmente, a incorporação de ácidos graxos N3 na membrana das células pode alterar seu estado redox, também afetando a função celular (CALDER 1998c e 2001c).

Dietas ricas em AG N3 apresentam potencial para alterar a produção de citocinas. Em estudos com animais, os AG N3 alteram a síntese de TNF, IL-1, IL-2, e IL-6. Em estudos com humanos os resultados são mais consistentes, onde voluntários saudáveis que se submeteram à suplementação aguda com óleo de peixe, reduziram a produção de IL-1, IL-6, TNF e IL-2 por células mononucleares periféricas (CALDER, 1999a). Em outro estudo foi mostrado que camundongos suplementados com EPA e DHA reduziram significativamente a expressão de RNAm para receptores de IL-2, em suas células T, após estimulação por Concanavalina A, sugerindo que esses ácidos graxos podem regular a expressão gênica para receptores de IL-2 (JOLLY e cols., 1998).

JEFFERY (1996, 1997a) mostrou ex vivo que a atividade das células NK (natural killer), em linfócitos de baço e, a proliferação induzida pelo mitógeno concanavalina A dos linfócitos do baço, diminuía conforme se reduzia a razão N3:N6 da dieta em ratos. Isso pode ser explicado devido às razões mais baixas apresentarem menores quantidades de ácido araquidônico e, conseqüentemente, menor produção de eicosanóides derivados dos AG N6, como o LTB₄ que é um potente ativador das células NK durante a resposta inflamatória. Em termos gerais pode-se resumir as ações dos AG N3 em diminuir a atividade das células NK e proliferação de linfócitos T, uma vez que estudo em ratos, indicou que tanto o ácido linoléico quanto o ácido α -linolénico reduzem a proliferação de linfócitos, e que o efeito do ácido α -linolénico é mais potente do que do ácido linoléico (CALDER, 2001c). Outros fatores estão associados a morte celular por apoptose ou necrose, inibição da produção de eicosanóides, atuar na sinalização intracelular, e poder levar ao desacoplamento dos complexos respiratórios da mitocôndria levando a morte celular, enquanto que os efeitos opostos são vistos na presença de AG N6 e/ou AG saturados (POMPÉIA, 2000). Alguns autores sugerem diferentes razões de N3:N6 para

uma melhor resposta do sistema imunitário. TAPIERO (2002) sugere 1:2, TASHIRO (1998) mostra que a razão 1:3 é menos inflamatória e JEFFERY (1997a), trabalha com valores de 1:7.

Os macrófagos são células que participam da função imunitária e desempenha papel importante no controle do desenvolvimento tumoral, e passou a ser estudado a partir de observações de células infiltrantes em massas sólidas. Na vigência de tumores, o macrófago pode exercer seu papel tumoricida de três maneiras:

- a) Pela inibição da divisão celular, através da liberação de diferentes mediadores (mecanismo independente de contato celular);
- b) De maneira mediada, dependente de contato, envolvendo a produção de TNF e espécies reativas do oxigênio (ROS), como radical superóxido e peróxido de hidrogênio (KLIMP e cols., 2002);
- c) Através de mecanismos de citotoxicidade celular dependente de anticorpos (TASHIRO, 1998).

A atividade do macrófago infiltrado na massa tumoral pode ser regulada por substâncias liberadas pelo tumor, capazes de reprimir a resposta desta célula. Outros estudos demonstram efeito facilitador do macrófago no desenvolvimento de certos tumores sólidos, através da liberação de fatores que favorecem a angiogênese, permitindo melhor aporte de nutrientes e oxigênio para o tecido tumoral (YOUNG e cols., 1998; KLIMP e cols., 2002). Os macrófagos são capazes de promover a angiogênese pela: a) secreção de enzimas proteolíticas que degradam a matriz extracelular, principalmente metaloproteases de matriz tipo 2 e 9 (MMP-2 e MMP-9) (HILDEBRAND e cols., 2002); b) pela secreção de fatores de crescimento tais como: fator transformante de crescimento β (TGF- β Transforming growth factor), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF – Platelet-derived growth factor), fator de crescimento endotelial de vasos (VEGF – Vascular endothelial growth factor) e TNF- α (LEEK e cols., 1996). Contudo, os macrófagos associados aos tumores também liberam substâncias como: interferons, angiostatina, fator plaquetário 4 e trombospondina, que inibem a angiogênese por inibirem a proliferação de células endoteliais (SUNDERKOTTER, 1994).

As citocinas são glicoproteínas produzidas por células após a ativação com estímulos específicos. As citocinas podem atuar de maneira autócrina e parácrina,

dependendo do tipo celular e expressão do receptor (DUNLOP & CAMPBELL, 2000). O TNF- α é a primeira citocina liberada, em resposta a endotoxinas bacteriana (LPS – Lipopolissacarídeo bacteriano), pelos monócitos e macrófagos. O TNF- α ativa neutrófilos, monócitos e macrófagos, para iniciar a destruição de células tumorais e bactérias, aumenta a expressão de moléculas de adesão na superfície de neutrófilos e células endoteliais, estimula os linfócitos T e B, regula o sistema de histocompatibilidade MHC e iniciam a produção de outras citocinas próinflamatórias como a IL-1 e IL-6 (CALDER, 1997c e 1998c).

Os macrófagos também são capazes de estimular os linfócitos T pela apresentação de antígenos e, além disso, quando são ativados, possuem alta atividade secretória, liberando espécies reativas de oxigênio (radical superóxido e peróxido de hidrogênio), espécies reativas do nitrogênio e citocinas, as quais possuem atividade microbicida e tumoricida (CALDER, 1998b).

Dados de nosso laboratório (TOGNI, 2003; PINTO Jr, 2004) e de outros (NIXON, 1996; WIGMORE e cols., 1996; CALDER, 1998c; SAUER e cols., 2000; WALLACE e cols., 2000; CALDER, 2000; RAO e cols., 2001; YAM e cols., 2001; MCENTEE & WHELAN, 2002) mostram que PUFA n-3 é capaz de diminuir a taxa de crescimento tumoral, o grau de caquexia em indivíduos com câncer e alterar a resposta imunitária. A pergunta que permanece é se este efeito realizado pelo PUFA n-3 é diretamente sobre a célula tumoral ou sobre o sistema imunitário. Neste estudo nós investigamos as duas hipóteses.

Grandes alterações ocorreram no padrão alimentar da população mundial nos últimos anos, principalmente na população ocidental. Associadas a outras alterações ambientais, como tabagismo, sedentarismo e radiação, a alimentação pode ser um fator desencadeante de doenças crônico-degenerativas, como o câncer. Nosso laboratório já demonstrou que a suplementação com óleo de peixe (TOGNI, 2002) e óleo de peixe associado a medicamentos anabolizantes (PINTO Jr., 2004) reduzem a caquexia e o crescimento tumoral em ratos portadores de tumor de Walker 256. Neste trabalho investigamos se o consumo balanceado de óleo de peixe e óleo de girassol melhora a caquexia e anorexia e sua função sobre o sistema imunitário dos ratos portadores de tumor.

2. OBJETIVOS

Visto que os ácidos graxos poliinsaturados interferem nas alterações metabólicas durante a síndrome da caquexia e sobre o sistema imunitário em modelos experimentais e em pacientes portadores de diferentes tipos de câncer, este trabalho tem como objetivo investigar o quadro de caquexia e o perfil da resposta imunitária em ratos tratados com dietas que apresentam diferentes razões de ácidos graxos N6 para N3 mediante a presença do tumor de Walker 256. Para alcançar este objetivo serão analisados os seguintes parâmetros:

- **PARÂMETROS DE CAQUEXIA**

- Glicemia e lactidemia, como indicadores de caquexia.
- Perfil lipídico sérico dos triacilglicerol, colesterol total e colesterol HDL.
- Taxa de peroxidação lipídica no tecido tumoral.
- Ingestão alimentar das dietas, peso corpóreo e do tumor.
- Determinar o perfil de ácidos graxos nas diferentes rações e no por cromatografia à gás (GC).

- **PARÂMETROS IMUNITÁRIOS**

- Determinar a taxa de proliferação de linfócitos do baço, timo e linfonodo mesentérico pela incorporação da (2^{14}C) – Timidina em DNA.
- Quantificar as populações de linfócitos T CD4^+ e CD8^+ do timo e linfonodo mesentérico por Citometria de Fluxo.
- Avaliar a atividade citotóxica dos macrófagos peritoniais através da produção de peróxido de hidrogênio, ânion superóxido e óxido nítrico.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Para a realização deste estudo foram utilizados 150 ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, var. *albinus*), obtidos do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram submetidos a ciclo claro/escuro (12/12 horas), com temperatura controlada a 22 ± 1 °C, com água e alimentação *ad libitum*. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Metabolismo Celular do Departamento de Fisiologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

3.2 REAGENTES E ENZIMAS

Todos os componentes dos tampões foram obtidos da Reagen Quimibrás Indústria Brasileira S/A. Lactato desidrogenase, amiloglucosidase, hexoquinase/glicose-6-fosfato desidrogenase, NAD, NADH, NADP e ATP, concanavalina A e LPS (lipopolissacarídeo bacteriano) e o meio de cultura (RPMI 1640) foram provenientes da Sigma Chemical Co. (EUA). O antibiótico (penicilina e estreptomicina) e o soro fetal bovino foram obtidos da Gibco. Os anticorpos monoclonais utilizados foram obtidos da Clontech - BD Bioscience, USA.

Material radioativo – $[2 - ^{14}\text{C}]$ -Timidina (50 mCi/mmol) foi obtida da New England Nuclear Research Products (Du Pont Company – Biotechnology Systems – EUA).

3.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Os animais, após o desmame (21 dias), foram separados em quatro por gaiola, nos seguintes grupos de acordo como tipo de dieta oferecida grupo N3 (N3), N6 (N6), razão N3:N6 de 1:6 (R6), razão 1:30 (R30) e razão 1:60 (R60). Estes grupos receberam suas respectivas rações até completarem 70 dias, e então metade do grupo foi inoculado com 1 mL subcutâneamente, no flanco direito, de suspensão de células do tumor de Walker 256, contendo 2×10^7 células/mL. Na outra metade do grupo foi inoculado salina 0,9%, formando dois grupos para cada dieta, um grupo sem tumor e outro portador de tumor de Walker (representados pela letra W). Os animais foram sacrificados ao 14º dia após a

inoculação do tumor, e seus tecidos e sangue retirados para análise bioquímica e cultivo de células como descrito abaixo.

3.4 OBTENÇÃO E TRANSPLANTE DAS CÉLULAS DO TUMOR DE WALKER 256

O tumor de Walker é um carcinossarcoma que desenvolveu-se espontaneamente na glândula mamária de uma rata grávida em 1928, no laboratório de George Walker que trabalhava no “John Hopkins University School of Medicine”. O tumor estava localizado na parte inferior da parede abdominal esquerda e apresentava tamanho médio de 5 centímetros de diâmetro. Durante a lactação o tumor regrediu, após o desmame ele reincidiu e cresceu rapidamente em seguida (GUAITANI, 1983).

Dois tipos de carcinomas de Walker 256 têm sido investigados por apresentar diferenças na interação com o hospedeiro. O do tipo A, invasivo e metastizante, tem um lento ritmo de crescimento induzindo a anorexia e a caquexia somente na fase terminal, garantindo uma sobrevivência média de 27 dias. O tumor do tipo B, não-invasivo e de crescimento rápido, induz a caquexia precocemente com sobrevida de 15 dias (GUAITANI, 1983).

Foi injetado intraperitonealmente em um rato macho adulto uma suspensão de 2×10^7 células/mL do tumor de Walker 256 tipo B. Após um período de cinco dias, quando constatado a ascite, o animal foi sacrificado e injetado 10 mL de solução salina 0,9% em sua cavidade abdominal. Em seguida, seu abdome foi massageado, e através de laparotomia mediana, foi coletado da cavidade abdominal, com auxílio da pipeta Pasteur de plástico, o fluido contendo as células tumorais. A contagem do número de células tumorais foi realizando-se câmara de Neubauer. Após a contagem inocula-se o 2×10^7 células/mL no flanco direito, subcutâneamente, nos animais para experimentação.

3.5 PREPARO DAS RAÇÕES

As rações foram preparadas semanalmente, armazenadas a - 20 °C e analisadas quanto ao perfil lipídico da dieta por GC. Todos os cuidados foram tomados para que as dietas permaneçam inalteradas durante o período experimental. A ração NUVILAB CR-1 constituiu como ração base.

Todas as rações apresentaram 30% de gordura do valor calórico total. Deste valor, 10% estavam sob a forma de gordura saturada e 20% sob a forma de gordura poliinsaturada. Foi acrescentado óleo de coco (Gordura de coco Brasil, refino de óleos LTDA), para ajustar o valor de gordura saturada e óleo de peixe (RP Scherer) e/ou óleo de girassol (Salada Especial, BUNGE Alimentos S. A.) para ajustar o valor de gordura poliinsaturada (conforme tabela abaixo).

O óleo de girassol foi escolhido porque apresenta de 50 a 75% de seus ácidos graxos na forma de ácido linoléico (AG N6), e o óleo de peixe pôr apresentar 10 a 15% de EPA e 5 a 12% de DHA (AG N3) (CALDER, 2001c).

Para a preparação das rações utilizadas, conforme quadro abaixo, nos experimentos foi utilizada a ração em pó, e a esta foram acrescentados os ácidos graxos, conforme o tipo de ração. Os ingredientes foram homogeneizados manualmente, e após o preparo, as rações foram fracionadas em pequenos lotes e mantidas em sacos plásticos a - 20 °C e foram oferecidas cerca de 120-150g aos animais diariamente.

Quadro 1. Composição das dietas fornecidas aos animais durante o tratamento.

COMPOSIÇÃO	Ração controle •	Ração N3	Ração R6	Ração R30	Ração R60	Ração N6
Carboidratos •	52%	52%	52%	52%	52%	52%
Proteínas •	22%	22%	22%	22%	22%	22%
Lípidios	4%	30%	30%	30%	30%	30%
Saturados *	1,12%	10%	10%	10%	10%	10%
Polinsaturados**	2,85%	20%	20%	20%	20%	20%
N3 (g)	-	161 g	23 g	5,3 g	2,6 g	-
N6 (g)	-	-	138 g	155,6 g	158,4 g	161 g

• GUIMARÃES (1992).

* representa um acréscimo de 101 g de gordura de coco.

** representa um acréscimo de 161 g de óleo de girassol e/ou de peixe.

4.3 Análise da composição nutricional das dietas

A dietas foram gentilmente analisadas, quanto à sua composição nutricional, pela NUTRIS Nutrição, Tecnologia & Sistemas LTDA. A concentração de gordura (extrato etéreo) na ração controle foi de $3,5 \pm 0,09$ g/100g de ração, na ração óleo de peixe foi de $21,46 \pm 1,14$ g/100g de ração, na ração razão N6:N3 de R6 foi de $25,21 \pm 0,71$ g/100g de ração, na R30 foi de $24,12 \pm 1,62$ g/100g de ração, na R60 foi de $24,47 \pm 0,43$ g/100g de ração e na dieta óleo de girassol foi de $27,7 \pm 0,8$ g/100g de ração (Tabela 1).

Tabela 1. Tabela da composição nutricional das dietas do grupo controle (C), dieta com óleo de peixe (N3), dieta com razão R6, R30 e R60 e dieta com óleo de girassol (N6).

Dietas	Proteína bruta (g/100g de ração)	Extrato etéreo (g/100g de ração)	Resíduo mineral (g/100g de ração)
Controle	$17,85 \pm 0,58$	$3,58 \pm 0,09$	$9,10 \pm 0,87$
N3	$17,99 \pm 0,50$	$21,46 \pm 1,14 *$	$7,71 \pm 1,39$
R6	$17,33 \pm 0,05$	$25,21 \pm 0,71 *$	$6,38 \pm 0,44$
R30	$17,58 \pm 0,46$	$24,12 \pm 1,62 *$	$6,38 \pm 0,22$
R60	$17,38 \pm 0,34$	$24,47 \pm 0,43 *$	$6,31 \pm 0,16$
N6	$16,73 \pm 0,09$	$27,71 \pm 0,89 *$	$6,15 \pm 0,05$

* $p > 0,05$ quando comparado a dieta controle.

Tabela 2. Tabela da composição lipídica das dietas do grupo controle (C), dieta com óleo de peixe (N3), dieta com razão R6, R30 e R60 e dieta com óleo de girassol (N6).

Dieta	Ácido linoléico (% ácidos graxos N-6)	EPA + DHA (% ácidos graxos N-3)	Razão N6:N3
CONTROLE	18.9	0	-
N3	1.3	34.9	0.04
R6	50.7	8.4	6.0
R30	48.9	1.5	32.6
R60	52.3	0.8	65.4
N6	54.4	< 0.1	> 550

3.6 DETERMINAÇÃO DO PESO DOS TECIDOS E DOS RATOS

Durante o experimento, os animais foram pesados a cada três dias no período da tarde, utilizando a balança Denver Instrument XL-410.

A massa tumoral e baço foram retirados dos animais e pesados em balança digital Denver Instrument XL-410, previamente aferida.

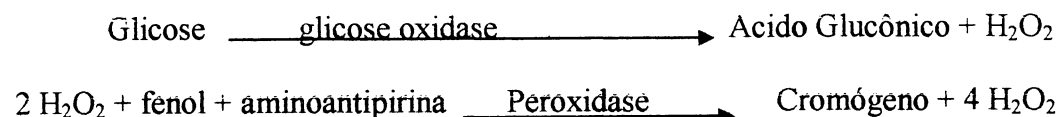
3.7 DETERMINAÇÃO DA INGESTÃO ALIMENTAR

Aos animais na gaiola (4 por gaiola) era oferecido 150g de ração/dia e a determinação da ingestão foi calculada mensurando-se a porcentagem de quanto da ração foi ingerida após 24 horas nos 14 dias de presença do tumor.

3.8 DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS NO SANGUE

3.8.1 GLICEMIA

A concentração de glicose circulante foi realizada pelo método enzimático colorimétrico, utilizando o Kit Glicose E enzimática da Labtest, segundo TRINDER (1969). A glicose na amostra sofre a seguinte reação:



A intensidade de cor emitida é diretamente proporcional à quantidade de glicose na amostra do soro. A leitura de absorbância foi feita no espectrofotômetro ULTROSPEC 2000 (Pharmacia) a 505 nm. A concentração de glicose foi expressa em mg/dL, e calculada pela fórmula:

$$[\text{Glicose}] = \frac{\text{D. O. amostra}}{\text{D. O. padrão}} \times \text{N}$$

[Glicose] = concentração de glicose na amostra

D. O. = densidade ótica

N = concentração no padrão (100 mg / 100 mL)

3.8.2 LACTATO SÉRICO

Foi determinado pelo método enzimático, segundo ENGEL & JONES (1978). Inicialmente foi realizado a desproteinização do soro, pela adição de 50 µL de ácido

tricloroacético (TCA a 25%) a 0,5 mL da amostra e a mistura agitada em vortex, centrifugada por 1 minuto a 13.000 rpm. Em seguida, foi coletado 200 µL do sobrenadante e adicionado 2 µL de indicador universal para permitir a visualização da neutralização do soro, pela adição de KOH / TRIS (0,5 M / 2 M), sinalizada pela coloração verde, indicando pH 7,0. Em seguida, foi pipetado 100 µL do soro neutralizado em tubos de ensaio contendo 1 mL do tampão do ensaio (descrito abaixo) e, após 45 minutos, efetuou-se pela leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda 340 nm. O princípio dessa mensuração consiste na conversão do lactato a piruvato pela ação da Lactato desidrogenase (LDh), ocorrendo consumo de NAD^+ com formação estequiométrica de NADH, o qual pode ser monitorado espectrofotometricamente, fornecendo as concentrações de lactato existente na amostra. Segundo a reação:



A medida da absorbância para o lactato sérico, foi calculada a concentração em µmol/mL, pela fórmula:

$$[\text{Lactato}] = \frac{\text{D. O.}}{6,22} \times \frac{\text{V1}}{\text{V}} \times \frac{\text{V2}}{\text{V3}} \times \frac{\text{V4}}{\text{V5}}$$

[Lactato] = concentração de lactato produzida

D. O. = densidade ótica

6,22 = constante

V = volume da amostra

V1 = volume da amostra + tampão de ensaio

V2 = volume do soro com proteínas + TCA

V3 = volume do soro com proteínas

V4 = volume do soro desproteínizado + volume de neutralização

V5 = volume do soro desproteínizado

Tampão de Ensaio (para 100 mL de H₂O destilada)	
EDTA	0,28 g
Glicina	2,8 g
Hidrato de Hidrazina	1,5 mL
LDh	0,4 mL
NAD ⁺	60 mg
pH	8,85

3.9 DETERMINAÇÃO DO PERFIL LIPÍDICO NO SORO.

3.9.1 COLESTEROL

Pelo método enzimático, conforme Kit Colesterol COD-ANA da Labtest. O colesterol total foi determinado utilizando-se associação da reação de oxidação catalisada pela colesterol oxidase, após hidrólise dos ésteres de colesterol com a reação de TRINDER (1969), com leitura de absorbância em 500nm. O Kit de dosagem é composto: tampão 50 mmol/L contendo 0,01g/dL, pH 7.0, colesterol esterase (≥ 150 U/L), colesterol oxidase (≥ 175 U/L), peroxidase (≥ 1000 U/L), 4-aminoantipirina 0,5nmol/L, fenol 2,4mmol/L, solução padrão 200mg/dL, preservativos e conservantes. As amostras foram preparadas segundo instruções do fabricante do Kit, e após a leitura em absorbância de 500nm, foi calculada a concentração de colesterol em mg/dL.

3.9.2 TRIACILGLICERÓL

Foi determinado pelo método enzimático colorimétrico que utiliza quatro enzimas, conforme o Kit TRIGLICÉRIDES GPO-ANA da Labtest. O glicerol liberado pela hidrólise do triacilglicerol contido no soro, catalisada pela lipase da lipoproteína é convertido pela ação da glicerolquinase em glicerol-3-fosfato, que é oxidado a dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio na presença de glicerolfosfato oxidase. A reação de acoplamento entre o peróxido de hidrogênio, 4-aminoantipirina e ESPAS é catalisada pela peroxidase produzindo a quinoneimina que tem máximo de absorbância em 540nm. O Kit é composto: solução tampão 50mmol/L, pH 6,5; acetado de Mg 5mmol/L, ESPAS 1 mmol/L, 4-aminoantipirina 0,7 mmol/L, ATP 0,3 mmol/L, glicerolquinase ≥ 800 U/L, glicerolfosfato ≥ 2500 U/L, lipase da lipoproteína ≥ 100 KU/L, peroxidase ≥ 350 U/L, azida sódica 1,54mmol/L. As amostras foram preparadas seguindo as instruções do fabricante, e após a leitura da absorbância em 540nm, a concentração de triacilgliceróis foi calculada em mg/dL.

3.9.3 COLESTEROL HDL

Foi utilizado o sistema para precipitação das lipoproteínas de baixa e de alta densidade (LDL e VLDL) e determinação do colesterol HDL no sobrenadante após centrifugação utilizando-se o sistema enzimático conforme Kit COLESTEROL HDL da Labtest, com leitura de absorbância a 500nm. O Kit contém: precipitante com ácido

fosfatogústico 1,5nmol/L e cloreto de magnésio 54 mmol/L, solução padrão 20 mg/dL de HDL e reagente de cor - COLESTEROL COD-ANA Labtest. Após a medida da absorbância em 500nm, foi calculada a concentração de colesterol HDL em mg/dL.

3.10 PEROXIDAÇÃO PELO MÉTODO HIDROPERÓXIDO

As amostras de tumor foram pesadas e solubilizadas PBS 0,1M na proporção 5 (1mg de amostra para 5µL de PBS) e levados para homogenização. As amostras foram processadas e retirou-se 100 µL de cada amostra e adicionou-se 900 µL da solução de trabalho. As amostras foram agitadas no vortex e incubadas em temperatura ambiente por trinta minutos, e depois as absorbâncias foram determinadas em espectrofotômetro, a 650 nm.

Solução de Trabalho (1000 mL)	
MeOH	90% metanol
xilenol orange	100 µM
H ₂ SO ₄	25 mM
BTH	4 mM
Fe ₂ SO ₄ e Nh ₄	250 µM

A fórmula utilizada para o cálculo foi:

$$\frac{D.O.}{\Sigma} \times \text{dil. do PBS} \times \text{dil. da solução de trabalho} \times \frac{1}{\text{mg de tecido}}$$

$$(\Sigma = 4,3 \times 10^{-4})$$

3.11 OBTENÇÃO DAS CÉLULAS DO SISTEMA IMUNITÁRIO

3.11.1 OBTENÇÃO DOS LINFÓCITOS

Dos animais sacrificados, os linfonodos mesentéricos, baço e timo foram retirados e dissecados. Os linfócitos foram obtidos por compressão destes órgãos no cilindro de malha, um sistema composto por dois cilindros de aço inox de diferentes diâmetros, de modo que um se encaixe no outro, cujas extremidades de cada um contem um sistema de malha. Deste sistema foram obtidos linfócitos íntegros e isolados de gordura. Os

linfócitos foram mergulhados em solução salina 0,9%, e posteriormente processados em papel filtro especial (Whatman nº 105) e centrifugados a 1800 rpm, 4°C, durante seis minutos. Este procedimento foi repetido por 3 vezes e em seguida os macrófagos foram utilizados para determinações de parâmetros imunitários, descritos abaixo.

3.11.2 CULTIVO CELULAR

Uma vez isolados os linfócitos, 2×10^5 células por poço, foram cultivados em meio de cultura RPMI-1640 enriquecido com 10% de soro fetal bovino e antibióticos (penicilina 10.000U e estreptomicina 10 mg/L), em placas de 96 poços (volume final de 200 μ L), a 37° C em atmosfera de 95% ar / 05% CO₂, por 48 horas. Os linfócitos foram estimulados com 20 μ L/poço de solução hidroalcoólica dos mitógenos Concanavalina A (Con A), estimulador da proliferação de linfócitos T e Lipopolissacárideos (LPS), estimulador de proliferação de linfócitos B e 20 μ L de uma solução contendo (2-¹⁴C)-Timidina (0,02 μ Ci/poço) e as células foram cultivadas por um período adicional de 18 horas, sob as mesmas condições descritas anteriormente.

Após este período, foram coletadas automaticamente em coletor múltiplo (Skatron Combi Multiple Cell Harvester, UK) em papéis filtro nº 11731 (Skatron Combi - UK). Neste processo não há necessidade de processos extrativos preparatórios para obtenção de DNA celular. Os discos de papéis contendo a radioatividade incorporada no DNA foram transferidos para tubos contendo 1 mL de líquido de cintilação e levados para mensuração da radioatividade incorporada em DNA em cintilador modelo Beckman LS 6500. Os resultados foram expressos em contagens por minuto (CPM).

3.11.3 ANÁLISE DE MARCADORES DE SUPERFÍCIE

A determinação quantitativa dos marcadores de superfície para linfócitos T helper (CD4⁺) e T citotóxico (CD8⁺) foi realizada através de Citometria de Fluxo, segundo metodologia descrita por JEFFERY e cols., (1997). Para isto, linfócitos coletados do timo e linfonodo mesentéricos (2×10^5 células/poço) foram incubados com anticorpos monoclonais contra CD4 (marcado com o fluorocromo PerCPe com absorvância de 488 nm e emissão maior que 640 nm – canal FL3) e CD8 (marcado com o fluorocromo FITC com absorvância de 488 nm e emissão maior que 530 nm – canal FL1) por 30 minutos,

depois foi feito a lavagem dos anticorpos com tampão azida PBS (0,05%). Os resultados foram expressos em porcentagem positiva de populações dos diferentes linfócitos.

3.12 OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS

Para obtenção de células peritoniais, os animais controle e portadores de tumor de Walker 256 foram exsanguinados por decapitação. Após a remoção da pele da região abdominal, 10 mL de tampão fosfato-salina (PBS – estéril), pH 7,4 foram injetados na cavidade peritoneal dos animais. Trinta segundos após a administração, a cavidade peritoneal será aberta e o fluido, contendo as células, aspirado com o auxílio de pipeta Pasteur de plástico, estéril. Em seguida, estas células foram centrifugadas (Eppendorf – Centrifuge 5810 R) a 1200 rpm, 4 °C, durante 5 minutos. Os macrófagos então, após descarte do sobrenadante, foram ressuspensos em PBS.

3.12.1 PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

A produção de peróxido de hidrogênio foi mensurada utilizando-se o método descrito por PICK & MIZEL (1981) modificado. Através da oxidação de vermelho fenol foi possível detectar a produção de H_2O_2 . Aliquotas de 100 μ L de solução de macrófagos e 10 μ L de éster de forbol miristato acetato (PMA – 20 μ M) foram colocadas em placas de ELISA. Após 1 hora de incubação no escuro (para prevenir a foto-oxidação), o sobrenadante foi descartado por inversão da placa e os “wells” receberam 100 μ L da solução de vermelho fenol contendo peroxidase (horseradish) e zymosan. Foi incubado durante 30 minutos e em seguida feita a leitura em espectrofotômetro a 620 nm (Microplate reader Bio-rad - Benchmark). Os resultados foram determinados a partir de curva padrão e expressos em μ mol/mg de proteína.

3.12.2 MENSURAÇÃO DO ÂNION SUPERÓXIDO

A geração de superóxido foi estimada através da redução de “nitroblue tetrazolium” (NBT), um composto amarelo lipossolúvel que se torna insolúvel e de cor azul no seu estado reduzido (MADHAVI e cols., 1994). Os macrófagos (450 μ L) foram incubados por 1 hora com 0,1% de NBT e 30 μ L de PMA (80 μ M) em PBS a 37 °C. Esta reação foi interrompida pela adição de um volume igual de ácido acético glacial. Esta mistura foi centrifugada rapidamente (30 segundos a 10.000 rpm) e o NBT reduzido, presente no sedimento, solubilizado em 900 μ L de ácido acético a 50% e sonificado (1

pulso). Os restos celulares foram sedimentados por nova centrifugação (30 segundos) e a absorbância do sobrenadante determinada a 550 nm em espectrofotômetro (Ultrospec – 2000). Os dados foram expressos em % de ânion superóxido por mg de proteína.

3.12.3 QUANTIFICAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO

A produção de óxido nítrico foi avaliada como descrito por STUEHR & MARLETTA (1985). O óxido nítrico (NO) formado é rapidamente convertido a nitrito/nitrato. Por este método quantifica-se NO mensurando o nitrito/nitrato, utilizando o reagente de Griess que, ao reagir com o nitrito, produzirá cor lilás com leitura a 550 nm. Para esta dosagem, os macrófagos foram coletados assepticamente, centrifugados e ressuspensos em meio RPMI-1640, ajustando-se para a concentração adequada de 2×10^5 células/well para placas de 96 wells. Após semear, deixou-se aderir por 2 horas a 37 °C numa atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C. Após a aderência, lavou-se 2 vezes com PBS e adicionou-se o meio RPMI com soro fetal bovino (10%) e, incubou-se por 24 h, nas condições gasosas citadas acima. Após o tempo de incubação, a placa foi centrifugada a 1500 rpm por 5 minutos, e o sobrenadante recolhido e misturado com o reagente de Griess (1:2). Para o preparo deste reagente, foram utilizadas soluções estoques de cloreto de naftiletilenodiamina (0,1%) dissolvido em água MiliQ e de sulfanilamida a 1% dissolvida em H₃PO₄ (5%). Pouco antes do uso, as soluções foram misturadas na proporção 1:1, formando o reagente de Griess propriamente dito. A padronização da dosagem do óxido nítrico foi feita preparando-se uma curva de NaNO₃. Estas soluções foram misturadas a 100 µL do reagente de Griess. Após, as amostras foram lidas em leitor de microplacas (Bench Mark – Biorad) a 550 nm. Por este procedimento, estabeleceu-se uma curva de calibração para a dosagem do óxido nítrico, com concentrações de 10 µM até 200 µM.

3.13 QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS

As proteínas foram quantificadas pelo método colorimétrico de BRADFORD (1976). Este método se baseia na ligação do corante (Coomassie Brilliant Blue G-250) com moléculas de proteínas da amostra, formando um complexo de cor azul. O corante reage, preferencialmente, com unidades de arginina e, numa extensão menor, com histidina, lisina, tirosina, triptofano e fenilalanina (COMPTON & JONES, 1985).

3.14 EXTRAÇÃO LIPÍDICA E DETERMINAÇÃO DO PERFIL LIPÍDICO POR CROMATOGRAFIA A GAS (GC)

Para a extração lipídica, as amostras da dieta foram pesadas (100mg) e adicionado 0,9 mL de metanol as mesmas e homogeneizadas a 25.000 rpm no BOSCH Centralfer CGS 27 por 1 minuto. Em seguida, foram agitadas no vortex e adicionou-se 4 mL de clorofórmio e 1 mL de PBS 0,1M. Foram agitadas novamente em vortex e centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos. Uma vez formada a solução bifásica, o infranadante foi coletado e passado a outro tubo de ensaio (tubo 2) e adicionou-se 2 mL de metanol:cloroformio (1:1). Agitou-se no vortex, centrifugou-se novamente a 1500 rpm por 5 minutos e coletou-se o infranadante, sendo este passado para um outro tubo de ensaio (tubo 3). Neste tubo foi adicionado a solução de Folch (clorofórmio: metanol: água na proporção de 3:47:48) e foi agitado no vortex, centrifugado a 1500 rpm por 5 minutos. Foi descartado a fase superior (hidrometanólica) e a fase inferior (orgânica) foi evaporada com brisa de N₂. Para a metanólise, as amostras foram diluídas em 200 µL de clorofórmio, acrescentado mais 500 µL de metanol HCl e armazenadas em estufa a 80° C por 4 horas. Depois foram neutralizadas com bicarbonato de sódio e extraídos os ácidos graxos com 1 mL de hexano por duas vezes e analisados pelo cromatógrafo.

3.15 ANALISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão da média e analisados por ANOVA seguido de pós-teste de Tukey, com nível de significância para $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Evolução da massa corpórea pré-tumor.

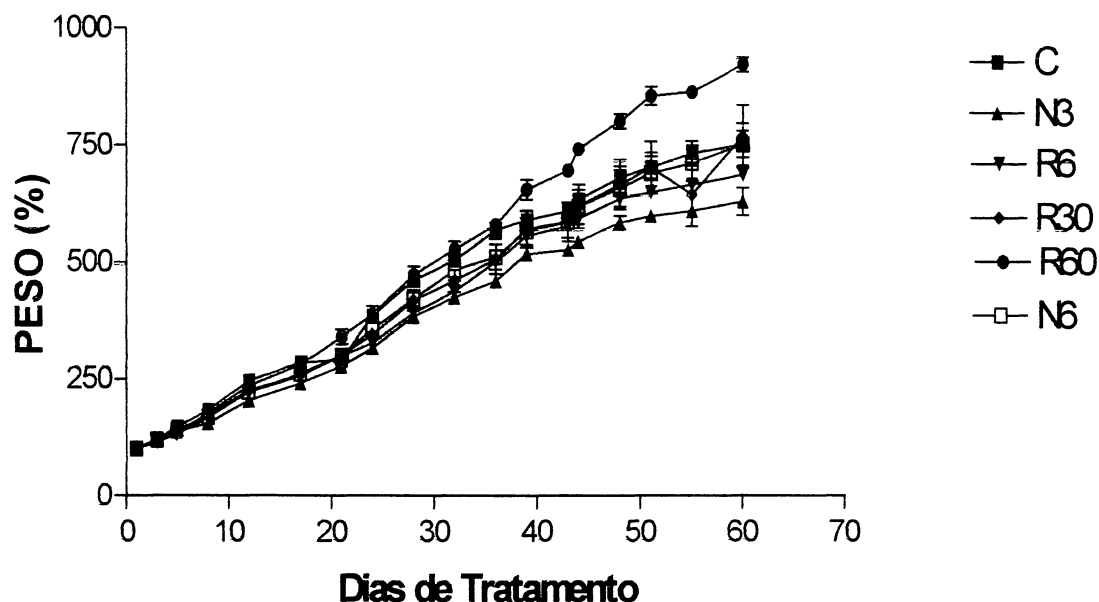


FIGURA 1. Porcentagem de variação de peso corpóreo dos animais desde o desmame (21 dias) até a fase adulta (70 dias) em intervalos de 5 dias, suplementados com dieta padrão (C), dieta com óleo de peixe (N3) ou óleo de girassol (N6), dieta com diferentes razões N6:N3 de 6:1 (R6), 30:1 (R30) 60:1 (R60). Os dados estão apresentados com média \pm erro padrão da média de 10 animais por grupo.

Na figura 1 está representada a porcentagem de variação de peso corpóreo dos animais dos diferentes grupos estudados desde o desmame (21 dias) até completarem 80 dias de vida. Ao final de 80 dias os animais tiveram, em média, incremento de 7,5 vezes de seu peso em relação ao dia 21. Não houve diferença significativa ($p>0,05$) quanto ao peso entre os grupos suplementados com as diferentes dietas.

4.1.2 Peso do tumor em percentagem à do peso corpóreo

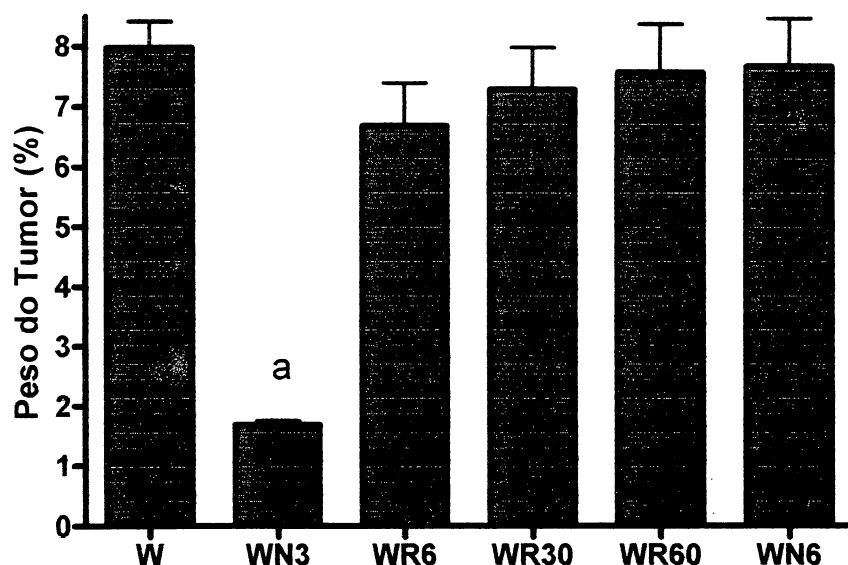


FIGURA 2. Peso do tumor (%) dos animais portadores de tumor suplementados com dieta padrão (W), dieta com óleo de peixe (WN3) ou óleo de girassol (WN6) e com dieta com diferentes razões N6:N3 de 6:1 (WR6), 30:1 (WR30), 60:1 (WR60). ^a $p < 0,05$ quando comparado ao W, WR6, WR30, WR60 e WN6. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média de 10 animais por grupo.

No grupo portador de tumor alimentado com ração padrão (W) a massa tumoral representou 8% da massa corpórea (Figura 2). A dieta com 30% de gordura rica em AGPI N3 (WN3) induziu a um crescimento tumoral que representou 1,8% da massa corpórea. Em contraposição, as diferentes razões de suplementação N6:N3 (R6:1, R30:1 e R60:1) e a rica em óleo de girassol (WN6) induziram a um crescimento da massa tumoral cuja percentagem foi similar à do W. Apenas no grupo WN3 esta redução foi significativamente menor quando comparada à dos demais grupos ($p < 0,05$).

4.2. RESULTADOS DOS PARÂMETROS DE CAQUEXIA

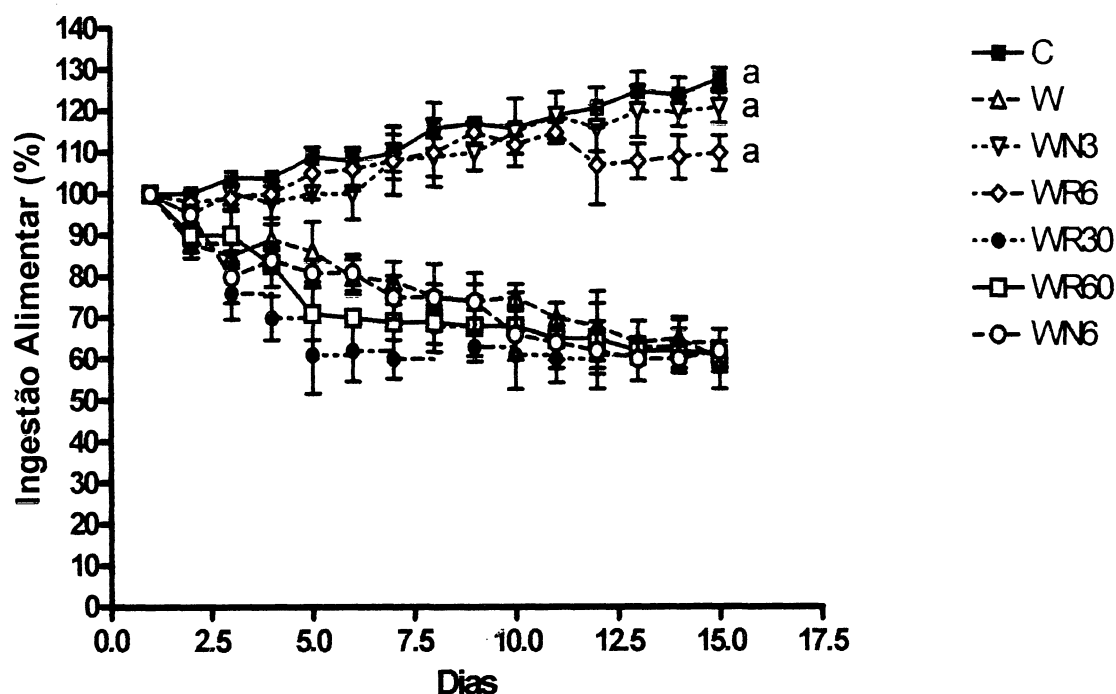


FIGURA 3. Consumo de ração (%) a cada dois dias dos animais do grupo sem tumor alimentado com ração padrão (C), portador de tumor alimentado com ração padrão (W), com óleo de peixe (WN3) ou óleo de girassol (WN6) e com dietas com diferentes razões de N6:N3 de 6:1 (WR6), 30:1 (WR30), 60:1 (WR60). ^a $p < 0,05$ comparado ao W, WR30, WR60 e WN6. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão de 10 animais por grupo.

Na figura 3 está apresentada a ingestão alimentar, em percentagem, dos animais do grupo sem tumor (C), portadores de tumor alimentados com ração padrão (W), portadores de tumor alimentados com dieta rica em óleo de peixe (WN3) ou girassol (WN6) e portadores de tumor alimentados com diferentes razões N6:N3 de 6:1 (W6:1), 30:1 (W30:1) e 60:1 (W60:1). A ingestão alimentar dos animais portadores de tumor no dia 1 foi de 30g/rato/dia. Ao final de 14 dias os animais do grupo C tiveram incremento de aproximadamente 20% na ingestão alimentar. O grupo W, por sua vez, apresentou redução de 40%, o que também foi observado para os animais dos grupos W30:1, W60:1 e WN6. Em contraste, os animais alimentados com dieta rica em óleo de peixe (WN3) e razão 6:1 (W6:1) tiveram ingestão alimentar similar à do grupo C e portanto foi significativamente diferente ($p < 0,05$) quando comparada à dos grupos W30:1, W60:1 e

WN6. A ingestão alimentar dos animais dos outros grupos não portadores de tumor alimentados com as diferentes dietas foram similares à do C ($p > 0,05$ dados não apresentados).

Tabela 3. Peso corpóreo, do tumor e da carcaça dos animais portadores de tumor do grupo controle (C), grupo controle sem suplementação (W), dieta com óleo de peixe (WN3), dieta com razão N6:N3 de 6:1 (WR6), de 30:1 (WR30), de 60:1 (WR60) e dieta com óleo de girassol (WN6). Os dados estão representados por média \pm EPM de 10 animais por grupo.

Dieta	Peso antes da inoculação do tumor (g)	Peso no 14º dia de inoculação do tumor (g)	Peso Tumor (g)	Peso carcaça (g)	Mudança de peso (g) (carcaça – peso inicial)	Mudança do peso (%) (carcaça – peso inicial)
C	267,2 \pm 3,43	-	-	295,2 \pm 4,15	28,0 \pm 2,68	9,48
W	257,2 \pm 11,23	259,6 \pm 9,71	19,4 \pm 1,4	239,9 \pm 9,7	- 18,0 \pm 3,9 ^a	- 6,7
WN3	256,7 \pm 15,13	276,2 \pm 14,34	7,73 \pm 2,72	271,3 \pm 15,54	14,6 \pm 0,68 ^b	5,38
WR6	260,5 \pm 17,19	281,7 \pm 12,60	20,66 \pm 4,04	271,5 \pm 11,49	11,0 \pm 0,98 ^b	4,05
WR30	264,2 \pm 12,73	302,7 \pm 8,26	20,14 \pm 2,73	272,7 \pm 7,87	8,5 \pm 0,74 ^b	3,11
WR60	256,5 \pm 14,39	268,5 \pm 14,8	17,49 \pm 2,94	251,7 \pm 16,79	- 4,8 \pm 0,48 ^{b,c}	- 1,90
WN6	234,2 \pm 15,36	248,7 \pm 20,7	14,55 \pm 2,66	232,5 \pm 19,97	- 2,3 \pm 0,66 ^{b,c}	- 0,98

^a $p < 0,05$ quando comparado ao grupo C.

^b $p < 0,05$ quando comparado ao grupo W.

^c $p < 0,05$ quando comparado aos grupos WN3, WR6 e WR30.

Na tabela 3 estão apresentados os dados dos pesos corpóreos (g), antes da inoculação do tumor e 14 dias pós inoculação, peso fresco do tumor (g), peso da carcaça (peso final do animal subtraído o peso do tumor) dos grupos alimentados com ração padrão (C), portadores de tumor alimentados com ração padrão (W), portadores de tumor e alimentados com ração rica em óleo de peixe (WN3) ou óleo de girassol (WN6), e com as razões N6:N3 de 6:1 (W6:1), 30:1 (W30:1) e 60:1 (W60:1). Os animais do grupo sem tumor (C) alimentados com ração padrão aumentaram sua massa corpórea em 28 g ao final de 14 dias. Nos animais portadores de tumor de Walker 256 alimentados com ração padrão o peso do tumor foi de 19 g e o peso da carcaça diminuiu em 18 g. A

suplementação com óleo de peixe nos animais portadores de tumor (WN3) induziu a uma taxa de crescimento tumoral 60% menor quando comparada à do W, com ganho de 14 g de massa corpórea. O peso do tumor nos animais alimentados com diferentes razão N6:N3 (W6:1, W30:1, W60:1) e rica em óleo de girassol (WN6) foi similar ao do grupo W ($p>0,05$). Ratos portadores de tumor dos grupos W6:1 e W30:1 apresentaram ganho de peso de 11 e 8,5 g, respectivamente, ao final de 14 dias. Por outro lado, a dieta dos grupos W60:1 e WN6 resultaram em redução da massa corpórea de -4,8 e -2,3 g, respectivamente. A massa corpórea dos animais dos outros grupos não portadores de tumor alimentados com as diferentes dietas foram similares à do C ($p>0,05$ dados não apresentados).

4.2 Parâmetros Bioquímicos de caquexia

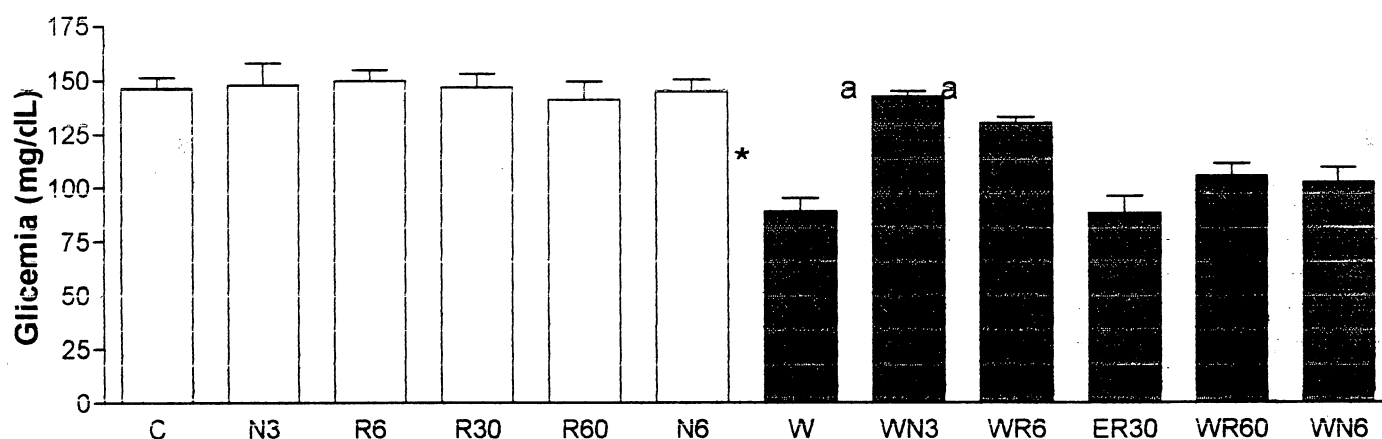


FIGURA 4. Concentração da glicemia (mg/dL) dos animais do grupo controle (C), dieta com óleo de peixe (N3), dieta com razão N6:N3 de 6:1 (R6), de 30:1 (R30), de 60:1 (R60) e dieta com óleo de girassol (N6) e portadores de tumor suplementados com dieta controle (W), dieta com óleo de peixe (WN3), dieta com N6:N3 de 6:1 (WR6), de 30:1 (WR30), de 60:1 (WR60) e dieta com óleo de girassol (WN6). Entre os animais não portadores de tumor não houve diferença significativa. * Diferença significativa ($p<0,05$) quando comparado aos animais sem tumor. ^a Diferença significativa quando comparado ao W, WR30, WR60 e WN6. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média de 10 animais nos grupos.

As suplementações com as diferentes dietas e razões não alteraram a glicemia dos animais sem tumor (Figura 4). Nos animais portadores de tumor alimentados com dieta padrão a glicemia ao final de 14 dias pós inoculação do tumor estava diminuída em 38% quando comparada à do C ($p<0,05$). O mesmo foi observado para os animais dos grupos W30:1, W60:1 e WN6. Por outro lado, nos animais dos grupos alimentados com dieta

rica em óleo de peixe (WN3) e razão N6:N3 de 6:1 (W6:1) a glicemia estava com valores similares à dos animais se tumor ($p>0,05$) mas significativamente maior quando comparada à dos W, W30:1, W60:1 e WN6 ($p<0,05$).

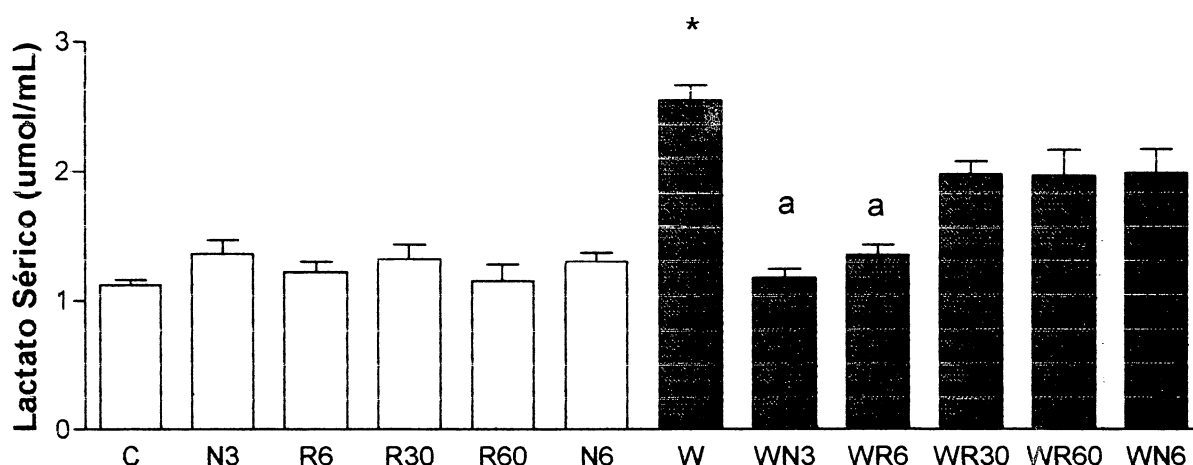


FIGURA 5. Concentração da lactato sérico ($\mu\text{mol/mL}$) dos animais do grupo controle (C), dieta com óleo de peixe (N3), dieta com N6:N3 de 6:1 (R6), de 30:1 (R30), de 60:1 (R60) e dieta com óleo de girassol (N6) e portadores de tumor suplementados com dieta controle (W), dieta com óleo de peixe (WN3), dieta com razão N6:N3 de 6:1 (WR6), de 30:1 (WR30), de 60:1 (WR60) e dieta com óleo de girassol (WN6). Entre os animais não portadores de tumor não houve diferença significativa. * Diferença significativa ($p<0,05$) quando comparada ao controle. ^a Diferença significativa ($p<0,05$) quando comparada à dos grupos W, WR30, WR60 e WN6. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média de 10 animais por grupos.

As suplementações com as diferentes dietas e razões não alteraram a laticidemia dos animais sem tumor (Figura 5). Nos animais portadores de tumor alimentados com dieta padrão a laticidemia ao final de 14 dias pós inoculação do tumor estava elevada 2,5 vezes quando comparada à do C ($p<0,05$). O mesmo foi observado para os animais dos grupos W30:1, W60:1 e WN6 cujo aumento estava, em média, 2 vezes quando comparada à dos animais sem tumor ($p<0,05$). Em contraste, nos animais dos grupos alimentados com dieta rica em óleo de peixe (WN3) e razão N6:N3 de 6:1 (W6:1) a laticidemia estava com valores similares à dos animais sem tumor ($p>0,05$) mas significativamente menor quando comparada à dos W, W30:1, W60:1 e WN6 ($p<0,05$).

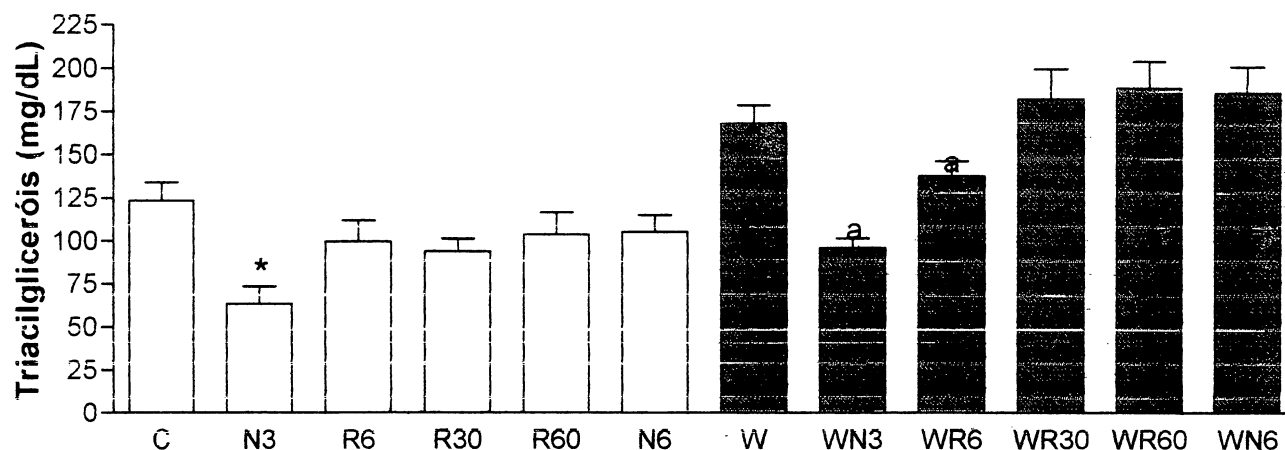


FIGURA 6. Concentração de triacilglicerol sérico (mg/dL) dos animais do grupo controle (C), dieta com óleo de peixe (N3), dieta com razão N6:N3 de 6:1 (R6), de 30:1 (R30), de 60:1 (R60) e dieta com óleo de girassol (N6) e portadores de tumor suplementados com dieta controle (W), dieta com óleo de peixe (WN3), dieta com razão N6:N3 de 6:1 (WR6), de 30:1 (WR30), de 60:1 (WR60) e dieta com óleo de girassol (WN6). * Diferença significativa ($p<0,05$) quando comparada à dos grupos C, R6, R30, R60 e N6. ^a Diferença significativa ($p<0,05$) quando comparada à dos grupos W, WR30, WR60 e WN6. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média de 10 animais por grupo.

As suplementações com as diferentes dietas e razões não alteraram a triacilglicerolemia (Figura 6), exceto no grupo alimentado com dieta rica em óleo de peixe (N3), onde houve redução de 50% ($p<0,05$). Nos animais portadores de tumor alimentados com dieta padrão a triacilglicerolemia ao final de 14 dias pós inoculação do tumor estava elevada em 1,4 vezes quando comparada à do C ($p<0,05$). O mesmo foi observado para os animais dos grupos W30:1, W60:1 e WN6 quando comparados aos sem tumor ($p<0,05$). Em contraste, nos animais dos grupos alimentados com dieta rica em óleo de peixe (WN3) e razão N6:N3 de 6:1 (WR6) a triacilglicerolemia estava com valores similares à dos animais sem tumor ($p>0,05$) mas significativamente menor quando comparada à dos W, W30, W60 e WN6 ($p<0,05$).

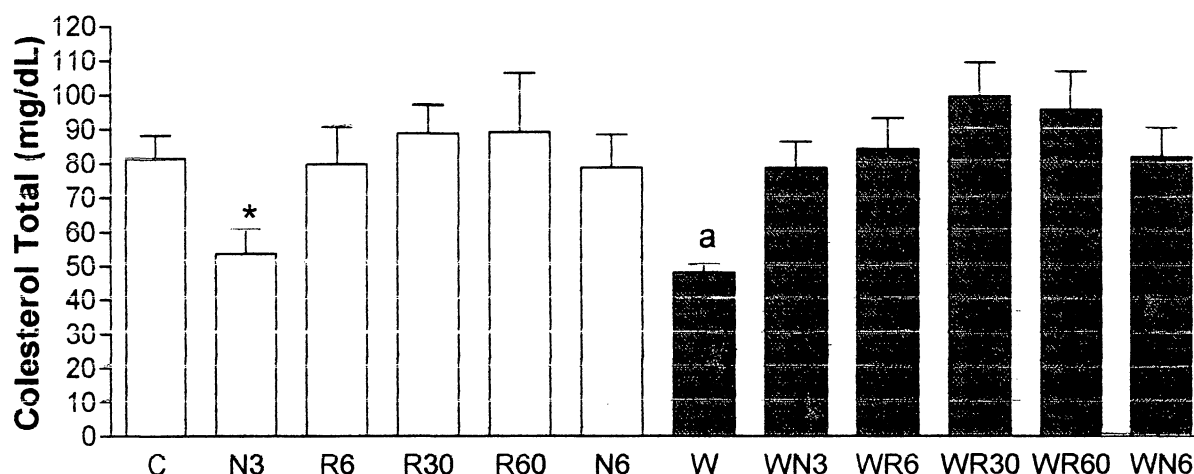


FIGURA 7. Concentração sérica de colesterol total (mg/dL) dos animais do grupo controle (C), dieta com óleo de peixe (N3), dieta com N6:N3 de 6:1 (R6), de 30:1 (R30), de 60:1 (R60) e dieta com óleo de girassol (N6) e portadores de tumor suplementados com dieta controle (W), dieta com óleo de peixe (WN3), dieta com razão N3:N6 de R6 (WR6), de 1:20 (WR30), de R60 (WR60) e dieta com óleo de girassol (WN6). * Diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparada à dos grupos C, R6, R30, R60 e N6. ^a Diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparada à dos grupos sem tumor e à dos grupos WN3, WR6, WR30, WR60 e WN6. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média de 10 animais por grupos.

A concentração de colesterol total (Figura 7) encontrava-se reduzida significativamente apenas nos animais sem tumor alimentados com dieta rica em óleo de peixe (N3) e nos animais portadores de tumor alimentados com ração padrão (W), quando comparada à dos demais grupos ($p < 0,05$). Não houve diferença estatística ao se comparar os demais grupos ($p > 0,05$).

A concentração sérica de colesterol HDL (Figura 8) não foi diferente entre os animais sem tumor alimentados com as diferentes rações e razões ($p > 0,05$). Nos animais portadores de tumor, por outro lado, houve queda significativamente da concentração de colesterol HDL, em média de 1,3 vezes, quando comparada à dos sem tumor, exceto para o portador de tumor suplementado com dieta rica em óleo de peixe (WN3), cuja concentração foi similar à dos sem tumor ($p > 0,05$).

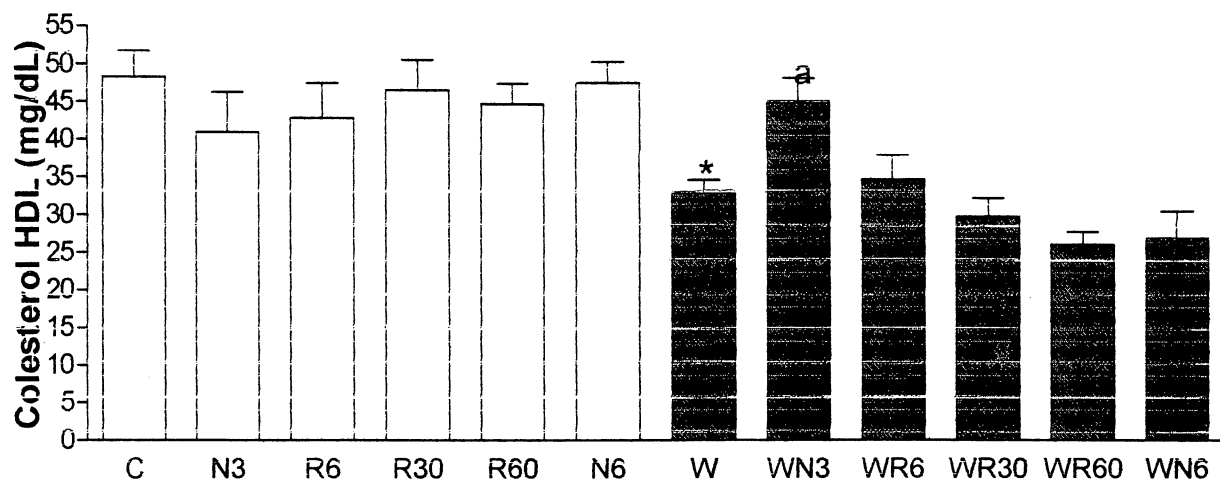


FIGURA 8. Concentração sérica de colesterol HDL (mg/dL) dos animais do grupo controle (C), dieta com óleo de peixe (N3), dieta com razão N6:N3 de 6:1 (R6), de 30:1 (R30), de 60:1 (R60) e dieta com óleo de girassol (N6) e portadores de tumor suplementados com dieta controle (W), dieta com óleo de peixe (WN3), dieta com razão N6:N3 de 6:1 (WR6), de 30:1 (WR30), de 60:1 (WR60) e dieta com óleo de girassol (WN6). Entre os animais não portadores de tumor não houve diferença significativa. *Diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparada aos grupos sem tumor e WN3. ^a Diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparada à dos grupos W, WR6, WR30, WR60 e WN6. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média de 10 animais por grupos.

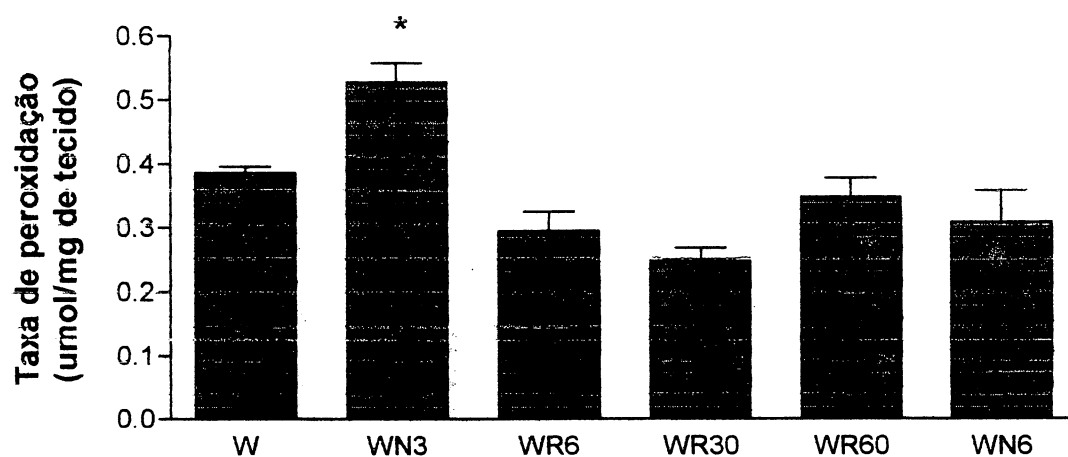


FIGURA 9. Peroxidação das células do tecido tumoral ($\mu\text{mol/mg}$ de tecido) dos animais portadores de tumor suplementados com dieta controle (W), dieta com óleo de peixe (WN3), dieta com N6:N3 de 6:1 (WR6), de 30:1 (WR30), de 60:1 (WR60) e dieta com óleo de girassol (WN6). Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média de 10 amostras por grupos.

A taxa de peroxidação lipídica (Figura 9) foi 34% maior nos tumores obtidos dos animais portadores de tumor alimentados com dieta rica em óleo de peixe (WN3) quando comparada à dos demais grupos com tumor ($p<0,05$). A taxa de peroxidação não foi diferente entre os demais grupos ($p>0,05$)

4.2 RESULTADOS DOS PARÂMETROS IMUNITÁRIOS

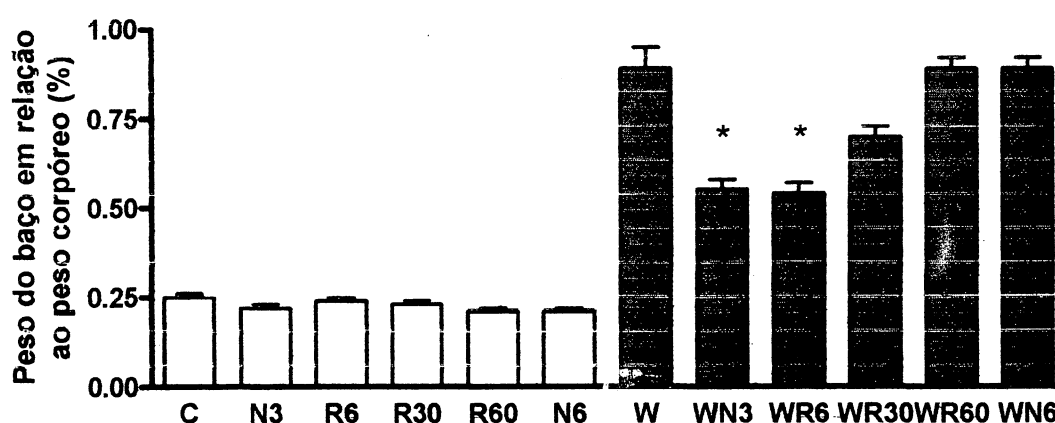


FIGURA 10. Peso do baço em % da massa corpórea dos animais sem tumor alimentados com ração padrão (C), dieta com óleo de peixe (N3) ou óleo de girassol (N6), ou com diferentes razões de N6:N3 de 6:1 (R6), 30:1 (R30) e 60:1 (R60) e portadores de tumor alimentados com dieta padrão (W), dieta com óleo de peixe (WN3) ou óleo de girassol (WN6), ou com diferentes razões de N6:N3 de 6:1 (WR6), 30:1 (WR30) e 60:1 (WR60). * $p<0,05$ quando comparado ao W, WR30, WR60 e WN6. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média de 10 animais nos grupos.

Na figura 10 está representados o peso do baço em relação a massa corpórea (%) dos animais sem e com de tumor alimentados com as diferentes dietas. Nos animais sem tumor não houve diferença significativa do peso do baço entre os grupos ($p>0,05$). Já nos animais portadores de tumor houve aumento significativo do peso do baço quando comparado ao dos sem tumor ($p<0,05$). No grupo alimentado com ração padrão (W), razão N6:N3 de 60:1 (W60:1) ou rica em óleo de girassol (WN6) este aumento foi 4 vezes maior ($p<0,05$). No grupo alimentado com dieta rica em óleo de peixe (WN3), razão N6:N3 de 6:1 (W6:1) e 30:1 (W30:1) este aumento foi 2 e 3 vezes maior quando comparado ao dos sem tumor ($p<0,05$). Entre os grupos portadores de tumor o peso do baço dos grupos WN3 e W6:1 foi 1,6 e 1,2 vezes menor quando comparado ao dos W, W60:1, WN6 e W30:1, respectivamente ($p<0,05$)

4.2.2 Proliferação dos linfócitos

Tabela 4. Proliferação, em CPM, dos linfócitos obtidos do timo de ratos não portadores do tumor de Walker 256 alimentados com ração padrão (C), dieta com óleo de peixe (N3) ou óleo de girassol (N6) ou com diferentes razões de N6:N3 de 6:1 (R6), 30:1 (R30) ou 60:1 (R60), na ausência e presença de concanavalina A (Con-A). Os dados estão apresentados como média \pm EPM (n).

GRUPO	Sem Con-A	Con-A
C	662,5 \pm 64,4 (10)	1237,0 \pm 65,1 (11) ^a
N3	381,0 \pm 31,00 (11) ^b	409,7 \pm 48,41 (9) ^c
R6	417,9 \pm 48,4 (10) ^b	494,4 \pm 91,8 (12) ^c
R30	558,2 \pm 49,09 (6)	924,9 \pm 52,53 (9) ^a
R60	1910 \pm 96,14 (12)	3079 \pm 161,1 (12) ^a
N6	1727 \pm 107,4 (10)	3117 \pm 154,2 (12) ^a

^a p<0,001 comparado a proliferação basal do seu próprio grupo.

^b p<0,001 comparado a proliferação basal dos grupos C, R30, R60 e N6.

^c p<0,001 comparado a proliferação ConA dos grupos W, WR30, WR60 e WN6.

Tabela 5. Proliferação, em CPM, dos linfócitos obtidos do timo de ratos portadores do tumor de Walker 256 alimentados com ração padrão (W), dieta com óleo de peixe (WN3) ou óleo de girassol (WN6) ou com diferentes razões de N6:N3 de 6:1 (WR6), 30:1 (WR30) ou 60:1 (WR60), na ausência e presença de concanavalina A (Con-A). Os dados estão apresentados como média \pm EPM (n).

GRUPO	Sem ConA	ConA
W	582 \pm 35 (12)	978 \pm 52 (12) ^a
WN3	606 \pm 85 (12) ^d	1254 \pm 112 (9) ^{a, c}
WR6	964 \pm 75 (10) ^d	1471 \pm 66 (12) ^{a, c}
WR30	2390 \pm 204 (9)	2378 \pm 175 (11) ^a
WR60	2088 \pm 155 (11)	2858 \pm 185 (9) ^a
WN6	1861 \pm 154 (10)	3030 \pm 144 (12) ^a

^a p<0,001 comparado a proliferação basal do seu próprio grupo.

^c p<0,001 comparado a proliferação ConA dos grupos W, WR30, WR60 e WN6.

^d p<0,001 comparado a proliferação basal dos grupos R30, R60 e N6.

A taxa de proliferação dos linfócitos do timo, obtidos dos ratos sem tumor, quando estimulados com o mitógeno concanavalina A (ConA), elevou-se significativamente ($p < 0,05$), exceto à dos linfócitos obtidos dos animais alimentados com as dietas ricas em óleo de peixe (N3) e com a razão N6:N3 de 6:1 (R6), onde a taxa foi similar à do grupo não estimulado ($p > 0,05$). Estas duas dietas foram capazes de manter a taxa de proliferação das células estimuladas pelo mitógeno similar à basal (Tabela 4). Interessantemente, as dietas ricas em óleo de girassol (N6) e a com razão N6:N3 de 60:1 (R60) induziram a uma taxa de proliferação basal 2,7 vezes maior quando comparadas às demais dietas ($p < 0,05$). Em adição, enquanto as demais dietas duplicaram a taxa de proliferação na presença de Con-A, R60 e WN6 elevaram, em média, 0,7 vezes a taxa de proliferação.

Na presença do tumor, a taxa de proliferação dos linfócitos do timo não foi alterada pela ração padrão tanto na ausência como na presença do mitógeno e foi similar à dos linfócitos dos animais sem tumor (Tabela 5). Em contraposição, a dieta rica em óleo de peixe (WN3) ou com razão N6:N3 de 6:1 (WR6) permitiu na presença de Con-A elevação da taxa de proliferação ($p < 0,05$) e ao compararmos com o grupo sem tumor (N3 e R6, a taxa basal era duas vezes maior. A dieta na razão N6:N3 de 30:1 (WR30:1) induziu os linfócitos dos ratos com tumor a uma taxa de proliferação basal elevada e com a presença do mitógeno esta não foi alterada ($p > 0,05$), mas ao compararmos com o grupo sem tumor na ausência de estímulo (R30) esta encontrava-se 4,2 vezes maior ($p < 0,05$) e 1,9 vezes maior quando comparada à do WR6, WN3 e W ($p < 0,05$). Já nos grupos com tumor WR60 e WN6, a taxa de proliferação foi similar à dos sem tumor (R60 e N6), não havendo diferença estatística entre eles, contudo foi 1,2 vezes maior quando comparada à dos W, WN3 e WN6 ($p < 0,05$).

Tabela 6. Proliferação, em CPM, dos linfócitos obtidos do baço de ratos não portadores do tumor de Walker 256 alimentados com ração padrão (C), dieta com óleo de peixe (N3) ou óleo de girassol (N6) ou com diferentes razões de N6:N3 de 6:1 (R6), 30:1 (R30) ou 60:1 (R60), na ausência e presença de concanavalina A (Con-A). Os dados estão apresentados como média \pm EPM (n).

GRUPO	Sem ConA	ConA
C	223,1 \pm 22,12 (10)	565,4 \pm 6,69 (11) ^a
N3	156,3 \pm 22,78 (10) ^b	446,2 \pm 45,9 (9) ^c
R6	200,6 \pm 22,48 (11) ^b	628,8 \pm 30,16 (10) ^c
R30	509,5 \pm 38,58 (10)	1653 \pm 126,3 (9) ^a
R60	3576 \pm 205,3 (12)	4902 \pm 254,6 (12) ^a
N6	2425 \pm 68,3 (10)	3946 \pm 226,2 (12) ^a

^a p<0,001 comparado a proliferação basal do seu próprio grupo.

^b p<0,001 comparado a proliferação basal dos grupos R60 e N6.

^c p<0,001 comparado a proliferação ConA dos grupos WR30, WR60 e WN6.

Tabela 7. Proliferação, em CPM, dos linfócitos obtidos do baço de ratos portadores do tumor de Walker 256 alimentados com ração padrão (W), dieta com óleo de peixe (WN3) ou óleo de girassol (WN6) ou com diferentes razões de N6:N3 de 6:1 (WR6), 30:1 (WR30) ou 60:1 (WR60), na ausência e presença de concanavalina A (Con-A). Os dados estão apresentados como média \pm EPM (n).

GRUPO	Sem Cona	ConA
W	820 \pm 46 (10)	1028 \pm 42 (12) ^a
WN3	752 \pm 56 (12) ^b	938 \pm 86 (11) ^c
WR6	764 \pm 112 (10) ^b	972 \pm 64 (10) ^c
WR30	1702 \pm 64 (11)	1860 \pm 189 (9) ^a
WR60	1494 \pm 92 (10)	1988 \pm 168 (10) ^a
WN6	1700 \pm 114 (8)	2376 \pm 216 (8) ^a

^a p<0,001 comparado a proliferação basal do seu próprio grupo.

^b p<0,001 comparado a proliferação basal dos grupos R30, R60 e N6.

^c p<0,001 comparado a proliferação ConA dos grupos WR30, WR60 e WN6.

A taxa de proliferação dos linfócitos obtidos do baço dos ratos sem tumor alimentados com ração padrão (C), na presença do mitógeno concanavalina A elevou-se em duas vezes (Tabela 6). Nos alimentados com dieta rica em óleo de peixe (N3) e razão

N6:N3 de 6:1 (R6) a adição do mitógeno elevou a taxa de proliferação em três vezes. A dieta com razão R30 induziu a uma proliferação basal duas vezes maior quando comparada à do C, N3 e R6 ($p<0,05$). A adição do mitógeno triplicou esta taxa ($p<0,05$) quando comparada a ausência do mitógeno e também quando comparada à dos C N3 e R6 na presença do mitógeno. A dieta R60 permitiu uma taxa de proliferação, na ausência do mitógeno, 8 vezes maior em média, quando comparada à do C, N3 e R6 ($p<0,05$) e 1,4 vezes à do WN6 ($p<0,05$). A adição do mitógeno incrementou a taxa de proliferação em 1,4 vezes quando comparada a ausência do mitógeno ($p<0,05$) e em 10 vezes quando comparada à dos C, N3 e R6 na presença do mitógeno ($p<0,05$), mas não diferente da do N6 com mitógeno ($p>0,05$). A presença do tumor induziu a um aumento na taxa de proliferação basal dos linfócitos dos ratos alimentados com ração padrão (W) de 4 vezes (Tabela 7), quando comparada à dos sem tumor (C), a qual foi significativa ($p<0,05$). A adição de mitógeno elevou a taxa em 1,25 vezes ($p<0,05$). No grupo com tumor e com dieta rica em óleo de peixe (WN3) a taxa de proliferação basal foi 5 vezes maior quando comparada à dos sem tumor (N3) ($p<0,05$), mas não foi diferente da do W ($p>0,05$). Interessantemente, a adição de Con-A no WN3 não modificou este perfil significativamente ($p>0,05$), entretanto foi duas vezes maior ($p<0,05$) quando comparada à dos sem tumor com Con-A (N3). Os linfócitos dos animais com tumor alimentados com razão N6:N3 de 6:1 (WR6) apresentaram taxa basal de proliferação similar à do W e WN3 ($p>0,05$) e 4 vezes, em média, maior quando comparada à dos C, N3 e R6 ($p<0,05$). A adição do mitógeno não modificou a taxa de proliferação significativamente ($p>0,05$), mas esta foi 2 vezes maior quando comparada à dos C, N3 e R6 com mitógeno ($p<0,05$). A taxa de proliferação basal dos linfócitos do baço dos animais com tumor com dieta WR30 foi 2 vezes maior quando comparada à do W, WN3 e WR6 ($p<0,05$), entretanto a adição do mitógeno não alterou a taxa de proliferação sendo similar a ausência de mitógeno ($p>0,05$). O mesmo foi observado para o grupo WR60 cujo comportamento foi idêntico ao do WR30. Interessantemente, o grupo WN6 apresentou a mesma taxa basal de proliferação dos WR30 e WR60, contudo o mitógeno elevou significativamente a taxa de proliferação em 1,4 vezes ($p<0,05$).

Tabela 8. Proliferação, em CPM, dos linfócitos obtidos do linfonodo mesentérico de ratos não portadores do tumor de Walker 256 alimentados com ração padrão (C), dieta com óleo de peixe (N3) ou óleo de girassol (N6) ou com diferentes razões de N6:N3 de 6:1 (R6), 30:1 (R30) ou 60:1 (R60), na ausência e presença de concanavalina A (Con-A). Os dados estão apresentados como média \pm EPM (n).

GRUPO	Proliferação Basal (CPM)	Proliferação ConA (CPM)
C	463,3 \pm 26,7 (11)	745,1 \pm 27,3 (10) ^a
N3	450,6 \pm 65,7 (11) ^b	709,4 \pm 60,83 (10) ^c
R6	344,7 \pm 43,2 (10) ^b	805,4 \pm 107,6 (9) ^c
R30	1311 \pm 98,6 (8)	1866 \pm 106,9 (12) ^a
R60	1669 \pm 81,1 (12)	2542 \pm 166,2 (12) ^a
N6	1354 \pm 134,2 (10)	2898 \pm 247,6 (10) ^a

^a p<0,001 comparado a proliferação basal do seu próprio grupo.

^b p<0,001 comparado a proliferação basal dos grupos R30, R60 e N6.

^c p<0,001 comparado a proliferação ConA dos grupos WR30, WR60 e WN6.

Tabela 9. Proliferação, em CPM, dos linfócitos obtidos do linfonodo mesentérico de ratos portadores do tumor de Walker 256 alimentados com ração padrão (W), dieta com óleo de peixe (WN3) ou óleo de girassol (WN6) ou com diferentes razões de N6:N3 de 6:1 (WR6), 30:1 (WR30) ou 60:1 (WR60), na ausência e presença de concanavalina A (Con-A). Os dados estão apresentados como média \pm EPM (n).

GRUPO	Proliferação Basal (CPM)	Proliferação ConA (CPM)
W	728 \pm 34 (11)	960 \pm 64 (12) ^a
WN3	450,6 \pm 30 (12) ^b	1146 \pm 40 (12) ^{a, c}
WR6	336 \pm 31 (10) ^b	852 \pm 42 (12) ^{a, c}
WR30	1510 \pm 178 (10)	2850 \pm 212 (9) ^a
WR60	1984 \pm 132 (10)	3100 \pm 144 (11) ^a
WN6	2526 \pm 116 (10)	3276 \pm 146 (11) ^a

^a p<0,001 comparado a proliferação basal do seu próprio grupo.

^b p<0,001 comparado a proliferação basal dos grupos C, R30, R60 e N6.

^c p<0,001 comparado a proliferação ConA dos grupos WR30, WR60 e WN6.

A taxa basal de proliferação dos linfócitos obtidos do linfonodo mesentérico (Tabela 8) dos animais sem tumor dos grupos C, N3 e R6 não foram diferentes entre si ($p>0,05$). A adição do mitógeno elevou a taxa de proliferação em 1,6 e 2,3 vezes quando comparada a ausência de estímulo nos grupos C, N3 e R6, respectivamente ($p<0,05$). As dietas com razões N6:N3 de 30:1 (R30), 60:1 (R60) e a rica em óleo de girassol (N6) induziram a um aumento médio na taxa basal de proliferação de 3,1, 3,9 e 3,2 quando comparadas à dos C, N3 e R6 ($p<0,05$). A adição do mitógeno incrementou a taxa de proliferação em 1,4 vezes no grupo R30, em 1,5 vezes no R60 e 2,1 vezes no N6. A presença do tumor fez com que a taxa de proliferação dos linfócitos no grupo alimentado com ração padrão (W) se elevasse em 1,6 vezes na ausência de estímulo quando comparada à do grupo sem tumor (C) ($p<0,05$) e a adição do mitógeno aumentou esta taxa de proliferação em 1,3 vezes ($p<0,05$) (Tabela 9). No grupo portador de tumor alimentado com ração rica em óleo de peixe (WN3), a taxa basal de proliferação foi similar à dos animais sem tumor (N3), contudo a adição do mitógeno permitiu uma elevação na taxa de proliferação de 2,5 vezes, significativamente maior quando comparada à ausência do mitógeno e à do N3 com mitógeno ($p<0,05$). A alimentação dos animais com tumor na razão de N6:N3 de 6:1 não alterou a taxa de proliferação na ausência do mitógeno quando comparada à dos sem tumor ($p>0,05$), mas a adição do mitógeno aumentou a taxa de proliferação em 2,5 vezes ($p<0,05$), contudo esta foi similar à dos sem tumor com mitógeno ($p>0,05$). Os linfócitos dos animais com tumor alimentados com dietas nas razões de 30 e 60:1 (WR30 e WR60) tiveram taxa de proliferação basal similar à dos seus pares sem tumor ($p>0,05$) e a adição do mitógeno elevou a taxa de proliferação em 1,9 e 1,6 vezes, respectivamente ($p<0,05$). Em adição, foram 1,5 e 1,2 vezes maior quando comparadas à de seus pares com mitógeno sem tumor ($p<0,05$). Interessantemente, a dieta rica em óleo de girassol (WN6) fez com que a taxa de proliferação basal dos linfócitos fosse 1,86 vezes maior quando comparada à do N6 ($p<0,05$) e a adição do mitógeno incrementou esta taxa em 1,3 vezes ($p<0,05$), não sendo diferente da do N6 sem tumor com mitógeno ($p>0,05$), mas significativa quando comparada à dos sem e com tumor alimentados com ração padrão, rica em óleo de girassol e razão 6:1 ($p<0,05$).

4.2.3 Marcadores de superfície (CD4⁺ e CD8⁺)

A percentagem de células positivas para CD4⁺ nos linfócitos do timo (Figura 11) dos animais alimentados com dieta rica em óleo de peixe (N3), óleo de girassol (N6), razão N6:N3 de 6:1 (R6), 30:1 (R30) e 60:1 (R60) foi significativamente maior quando comparada à dos animais alimentados com ração regular ($p < 0,05$). Não houve diferença quando comparou-se as diferentes dietas entre si ($p > 0,05$).

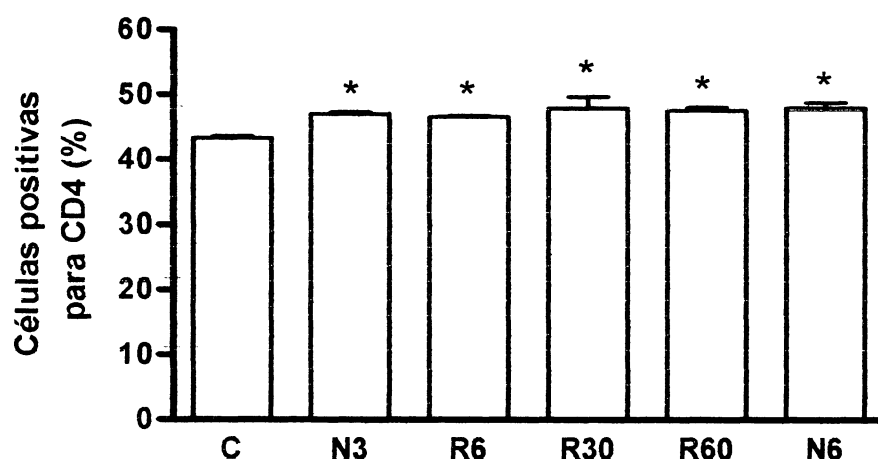


Figura 11. Porcentagem de células positivas para CD4 em linfócitos obtidos do timo de ratos não portadores de tumor alimentados com ração padrão (C), dieta com óleo de peixe (N3), dieta com razão N6:N3 de 6:1 (R6), de 30:1 (R30), de 60:1 (R60) e dieta com óleo de girassol (N6). Os dados estão apresentados como média \pm EPM de 10 amostras por grupo. $p < 0,05$ quando comparado a N3, R6, R30, R60 e N6.

A presença do tumor (Figura 12) não modificou a percentagem de células no grupo alimentado com ração padrão (W). A dieta com óleo de peixe (WN3) elevou significativamente a percentagem de células positivas para CD4 quando comparada a todos os grupos ($p < 0,05$), exceto ao WR6 ($p > 0,05$). Apesar da tendência de elevação da população no grupo WR6, esta não foi diferente ao comparar-se com os demais grupos ($p > 0,05$).

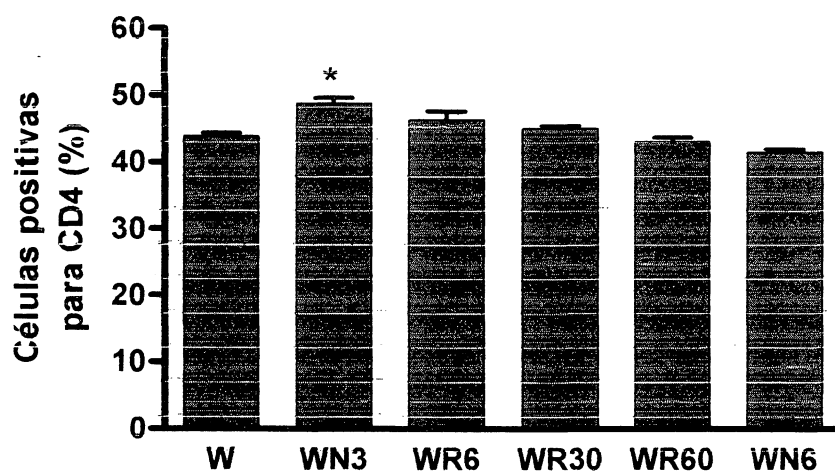


Figura 12. Porcentagem de células positivas para CD4 em linfócitos obtidos do timo de ratos portadores de tumor alimentados com ração padrão (W), dieta com óleo de peixe (WN3), dieta com razão N6:N3 de 6:1 (WR6), de 30:1 (WR30), de 60:1 (WR60) e dieta com óleo de girassol (WN6). Os dados estão apresentados como média \pm EPM de 10 amostras por grupo. * $p < 0,05$ quando comparado à do W, WR30, WR60 e WN6.

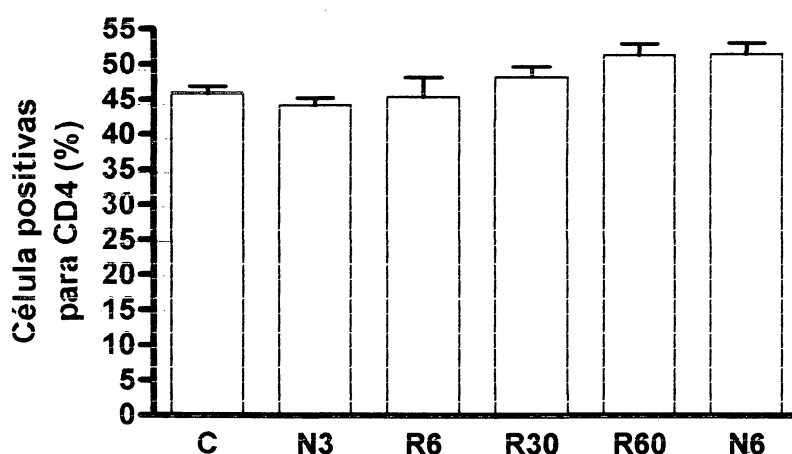


Figura 13. Porcentagem de células positivas para CD4 em linfócitos obtidos do linfonodo mesentérico de ratos não portadores de tumor alimentados com ração padrão (C), dieta com óleo de peixe (N3), dieta com razão N6:N3 de 6:1 (R6), de 30:1 (R30), de 60:1 (R60) e dieta com óleo de girassol (N6). Os dados estão apresentados como média \pm EPM de 10 amostras por grupo. Não houve diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$).

A percentagem de células CD4 positivas no linfonodo mesentérico nos diferentes grupos alimentados com as diferentes dietas não foi diferente ($p > 0,05$), apesar de na razão R30, R60 e dieta rica em óleo de girassol ter provocado tendência em elevação na percentagem (Figura 13). A presença do tumor (W) não alterou significativamente o

número de células CD4 positivas quando comparado aos do sem tumor (C) (Figura 14). A alimentação com dieta rica em óleo de peixe (WN3), razão 6:1 e 30:1 (WR6 e WR30) induziu a aumento ($p<0,05$) da população CD4 positiva quando comparada à alimentada com ração padrão, (W), óleo de girassol (WN6) e razão 60:1 (WR60), as quais, entre si, não foram diferentes ($p>0,05$).

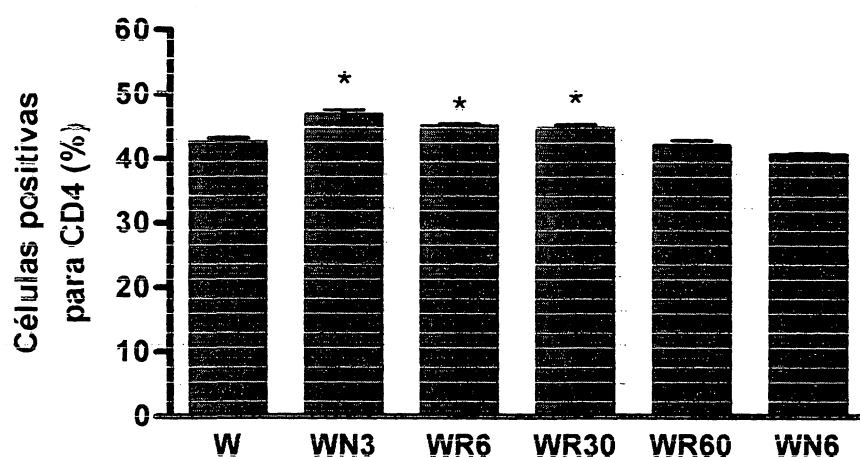


Figura 14. Porcentagem de células positivas para CD4 em linfócitos obtidos do linfonodo mesentérico de ratos portadores de tumor alimentados com ração padrão (W), dieta com óleo de peixe (WN3), dieta com razão N6:N3 de 6:1 (WR6), de 30:1 (WR30), de 60:1 (WR60) e dieta com óleo de girassol (WN6). Os dados estão apresentados como média \pm EPM de 10 amostras por grupo.. * $p<0,05$ quando comparado à do W, WR60 e WN6.

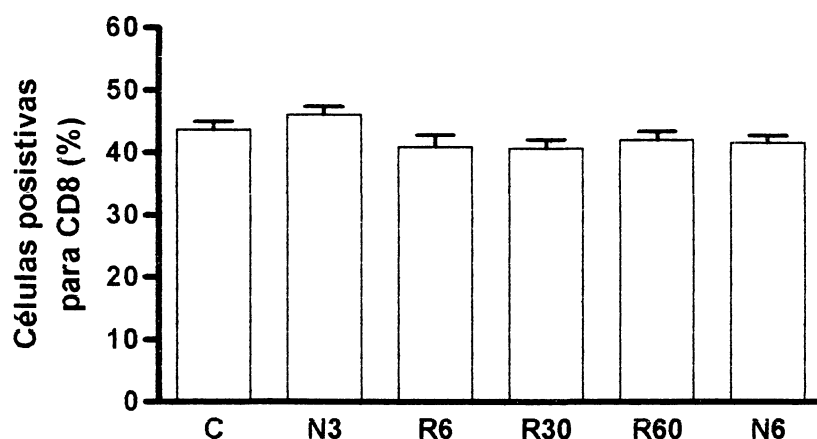


Figura 15. Porcentagem de células positivas para CD8 em linfócitos obtidos do timo de ratos não portadores de tumor alimentados com ração padrão (C), dieta com óleo de peixe (N3), dieta com razão N6:N3 de 6:1 (R6), de 30:1 (R30), de 60:1 (R60) e dieta com óleo de girassol (WN6). Os dados estão apresentados como média \pm EPM de 10 amostras por grupo. Não houve diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$).

A percentagem de células positivas para CD8 (Figura 15), nos grupos sem tumor alimentados com as diferentes dietas não foi diferente entre si ($p > 0,05$), apesar de leve tendência de aumento no grupo alimentado com a dieta rica em óleo de peixe (N3).

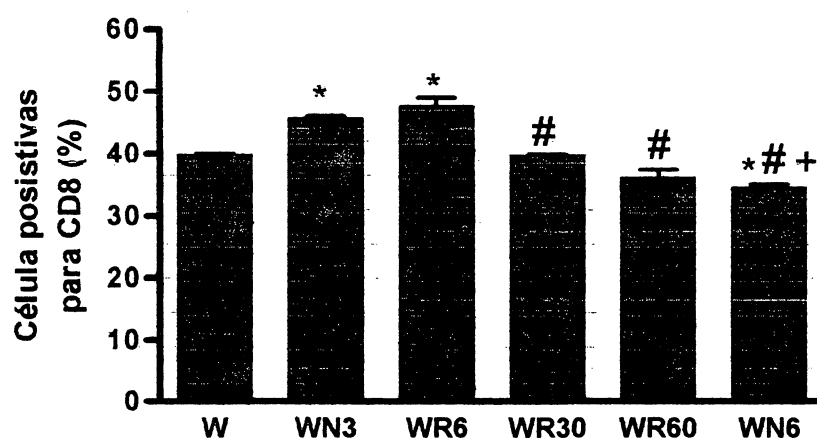


Figura 16. Porcentagem de células positivas para CD8 em linfócitos obtidos do timo de ratos portadores de tumor alimentados com ração padrão (W), dieta com óleo de peixe (WN3), dieta com razão N6:N3 de 6:1 (WR6), de 30:1 (WR30), de 60:1 (WR60) e dieta com óleo de girassol (WN6). Os dados estão apresentados como média \pm EPM de 10 amostras por grupo. * $p < 0,05$ quando comparado ao W. # $p < 0,05$ quando comparado ao WN3 e WR6. + $p < 0,05$ quando comparado ao WR30.

A presença do tumor (W) fez com que a percentagem de células CD8 positiva (Figura 16) fosse reduzida significativamente quando comparada à dos linfócitos dos animais alimentados com ração padrão (C). Nos animais com tumor alimentados com ração rica em óleo de peixe (WN3) e razão 6:1 (WR6), a percentagem de células CD8 positivas elevou-se significativamente quando comparada à do W, WR30, WR60 e WN6. A dieta rica em óleo de girassol provocou queda da população CD8 quando comparada à do grupo W, alimentado com ração padrão. WR30 e WR60 não tiveram alteração da população CD8 quando comparada à do W.

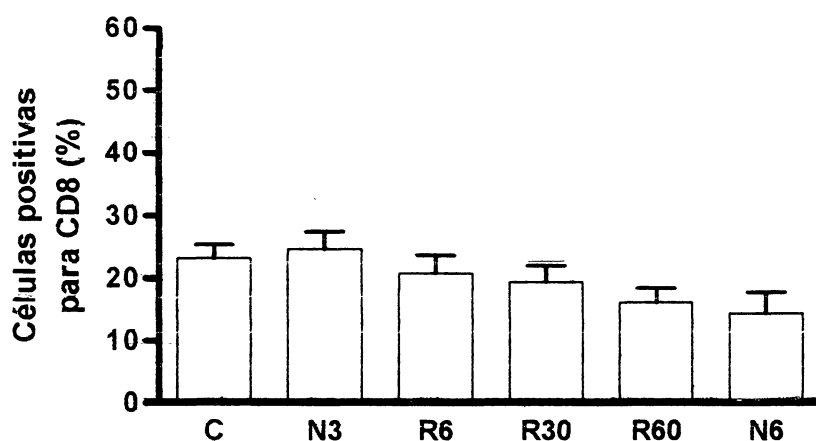


Figura 17. Porcentagem de células positivas para CD8 em linfócitos obtidos do linfonodo mesentérico de ratos não portadores de tumor alimentados com ração padrão (C), dieta com óleo de peixe (N3), dieta com razão N6:N3 de 6:1 (R6), de 30:1 (R30), de 60:1 (R60) e dieta com óleo de girassol (N6). Os dados estão apresentados como média \pm EPM de 10 amostras por grupo. Não há diferença significativa entre os grupos.

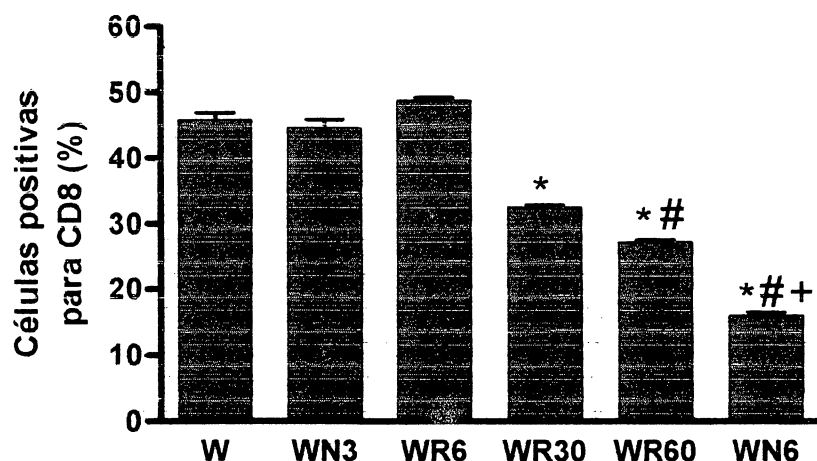


Figura 18. Porcentagem de células positivas para CD8 em linfócitos obtidos do linfonodo mesentérico de ratos portadores de tumor alimentados com ração padrão (W), dieta com óleo de peixe (WN3), dieta com razão N6:N3 de 6:1 (WR6), de 30:1 (WR30), de 60:1 (WR60) e dieta com óleo de girassol (WN6). Os dados estão apresentados como média \pm EPM de 10 amostras por grupo. * $p < 0,05$ quando comparado a W, WN3 e WR6. # $p < 0,05$ quando comparado a WR30. + $p < 0,05$ quando comparado a WR60.

A suplementação com as diferentes dietas entre os diferentes grupos (Figura 17) não promoveu diferença significativa quanto a percentagem de células CD8 positiva nos linfócitos obtidos do linfonodo mesentérico ($p > 0,05$), entretanto estas foram praticamente 50% menores quando comparados à população de linfócitos obtidos do timo, como mostrado na figura 15. A presença do tumor não modificou a percentagem de células CD8 positiva nos animais alimentados com ração padrão (W) quando comparados aos sem tumor (C). A dieta rica em óleo de peixe e razão 6:1 (WR6) também não alterou a percentagem de células CD8 positivas. Já a razão 30:1 (WR30), 60:1 (WR60) e rica em óleo de girassol (WN6) diminuíram significativamente esta população quando comparada à dos grupos W, WN3 e WR6 (Figura 18). Em adição, houve redução significativa quando comparou-se a razão 30:1 (WR30) com 60:1 (WR60), onde esta foi significativamente menor ($p < 0,05$), entretanto não atingiu os valores dos animais sem tumor. Finalmente, a dieta com óleo de girassol foi a que teve maior ação de diminuir a população de células CD8 positivas, sendo significativamente menor quando comparada a qualquer outra dieta investigada ($p < 0,05$).

4.2.4 Produção das espécies reativas de oxigênio

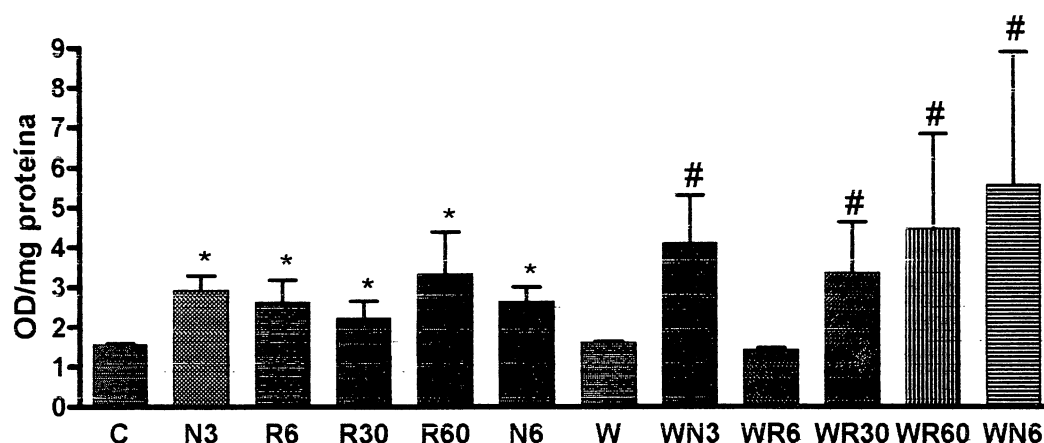


Figura 19. Produção de ânion superóxido pelos macrófagos peritoneais obtidos de ratos sem e com tumor alimentados com dieta padrão (C e W), dieta rica em óleo de peixe (N3 e WN3) ou óleo e girassol (N6 e WN6), razão N6:N3 de 6:1 (R6 e WR6), 30:1 (R30 e WR30) ou 60:1 (R60 e WR60). Os dados estão apresentados como média \pm EPM de 3 amostras por grupo. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo C. # $p < 0,05$ quando comparado ao W.

A produção de ânion (Figura 19) foi significativamente elevada pelos macrófagos peritoneais de ratos alimentados com as diferentes dietas quando comparada à dos com ração padrão (C) ($p < 0,05$). A presença do tumor nos animais alimentados com ração padrão (W) não alterou a taxa de produção de ânion superóxido quando comparado ao grupo C. Contudo, na presença de tumor as diferentes dietas tiveram ação estimuladora na produção de ânion superóxido, entretanto não diferente daquela de seus pares sem tumor ($p > 0,05$), mas foi acima da dos animais com tumor alimentados com ração padrão (W) ($p < 0,05$).

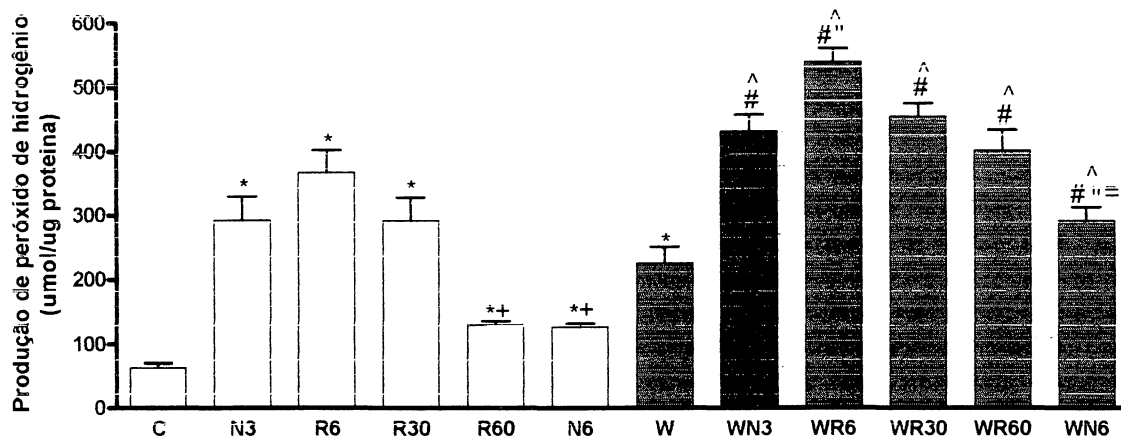


Figura 20. Produção de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais obtidos de ratos sem e com tumor alimentados com dieta padrão (C e W), dieta rica em óleo de peixe (N3 e WN3) ou óleo e girassol (N6 e WN6), razão N6:N3 de 6:1 (R6 e WR6), 30:1 (R30 e WR30) ou 60:1 (R60 e WR60). Os dados estão apresentados como média \pm EPM de 8 amostras por grupo. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo C. + $p < 0,05$ quando comparado ao N3, R6 e R30. # $p < 0,05$ quando comparado ao W. ^ $p < 0,05$ quando comparado ao WN3, WR30 e WR60. = $p < 0,05$ quando comparado ao WR6. ^ $p < 0,05$ quando comparado à mesma dieta mas sem tumor.

Nos animais não portadores de tumor, a alimentação com dieta rica em óleo de peixe, razão N6:N3 de 6 (R6) e 30:1 (R30) incrementaram a produção de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais em 4,6, 5,8 e 4,6 vezes, respectivamente, o que foi significativo quando comparado à dos animais suplementados com ração padrão (C) (Figura 20). A dieta com razão 60:1 (R60) e rica em óleo de girassol (N6), também induziram a aumento na produção de peróxido de hidrogênio, entretanto esta foi de 2 vezes quando comparada ao C ($p < 0,05$) e menor que à dos N3 (2,2 vezes), R6 (2,9 vezes) e R30 (2,2 vezes). A presença do tumor induziu a uma aumento de 3,6 vezes na produção de peróxido de hidrogênio quando comparada ao C ($p < 0,05$). A presença do tumor associado a dieta fez com que a produção de peróxido de hidrogênio aumentasse em 1,9 vezes no grupo alimentado com dieta rica em óleo de peixe (WRN3), em 2,4 vezes no grupo com razão 6:1 (WR6), em 2 e 1,8 vezes nos grupos com razão 30:1 (WR30) e 60:1 (WR60), respectivamente ($p < 0,05$). Na dieta com óleo de girassol também foi observado aumento da produção pelos macrófagos peritoneais, entretanto em magnitude menor, 1,3 vezes ($p < 0,05$). A razão 6:1 (WR6) associado a presença do tumor foi a que induziu maior produção de peróxido de hidrogênio sendo significativamente diferente quando comparada à de todos os demais grupos com tumor ($p < 0,05$). Quando comparado aos

seus pares submetidos a mesma dieta, a presença do tumor induziu a aumento na produção de peróxido de hidrogênio ($p<0,05$).

Tabela 10. Produção, em $\mu\text{mol/L}$, de óxido nítrico pelos macrófagos peritoniais obtidos de ratos não portadores e portadores do tumor de Walker 256 alimentados com ração padrão (W), dieta com óleo de peixe (WN3) ou óleo de girassol (WN6) ou com diferentes razões de N6:N3 de 6:1 (WR6), 30:1 (WR30) ou 60:1 (WR60), na ausência e presença de LPS. Os dados estão apresentados em $\mu\text{mol/L}$ como média \pm EPM (n).

GRUPO	Sem LPS	Com LPS	GRUPO	Sem LPS	Com LPS
C	5,24 \pm 1,6 (11)	12,95 \pm 2,4 (11) ^a	W	16,67 \pm 3,2 (12)	20,3 \pm 2,6 (12)
N3	14,7 \pm 2,0 (14)	20,0 \pm 2,7 (13) ^b	WN3	16,0 \pm 2,2 (12)	22,8 \pm 3,3 (12) ^c
R6	12,0 \pm 1,9 (12)	16,7 \pm 2,0 (13) ^b	WR6	12,9 \pm 2,2 (12)	20,6 \pm 4,4 (12) ^c
R30	6,8 \pm 0,6 (7)	9,2 \pm 0,6 (7)	WR30	14,4 \pm 1,8 (12)	13,2 \pm 1,3 (12)
R60	11,0 \pm 2,6 (11)	11,7 \pm 2,4 (11)	WR60	11,43 \pm 1,7 (12)	12,25 \pm 1,9 (12)
N6	9,6 \pm 1,6 (11)	10 \pm 1,9 (11)	WN6	16,7 \pm 0,8 (12)	11,2 \pm 5,2 (12)

^a quando comparado à C sem LPS ($p<0,05$);

^b quando comparado R30, R60 e N6 com LPS ($p<0,05$);

^c quando comparado a WR30, WR60 e WN6 com LPS ($p<0,05$)

A Tabela 10 indica a produção de óxido nítrico pelos macrófagos foi mensurada em $\mu\text{mol/L}$, produzido pelas células não estimuladas e estimuladas com LPS. Não houve diferença entre os animais portadores e não portadores de tumor ($p>0,05$). Nos animais não portadores de tumor, observou-se que apenas as dietas N3 e R6 apresentam maior produção de óxido nítrico quando comparado aos outros grupos não portadores de tumor. Já nos animais portadores de tumor, as células tratadas com as dietas ricas em óleo de peixe (WN3 e WR6) apresentaram maior produção de óxido nítrico quando comparadas à das dietas WR30, WR60 e WN6.

5. DISCUSSÃO

Fatores ambientais podem contribuir para o desenvolvimento de muitos tipos de câncer. Foi estimado que 30% destes casos são afetados pelo padrão alimentar, sendo que dietas com alto teor de gordura, quase sempre, estão relacionadas a esses cânceres. (McENTEE & WHELAN, 2002). Estudos epidemiológicos e experimentais mostram evidências de que não somente a quantidade de gordura consumida, mas também o tipo de gordura é importante no desenvolvimento do câncer (DOMMELS e cols., 2002). Simopoulos (2003) tem advogado a favor da proporção de ácidos graxos n6:n-3 de R6 na dieta como a mais saudável e protetora contra o câncer. Neste trabalho foi investigado a hipótese em modelo de ratos portadores de tumor de Walker 256.

Atualmente, a porcentagem de gordura dietética consumida pela população ocidental corresponde a 40% do valor calórico consumido, sendo que a necessidade média para a população adulta saudável é em torno de 25-30% das exigências energéticas (DRI, 1999). Este excesso de calorias consumidas na forma de gordura, tem sido relatada estar associada a outros fatores que colaboram para o aumento na prevalência de doenças crônico-degenerativas, tais como as cardiovasculares, câncer e obesidade (ROSE e CONNOLLY, 1999). Esta abordagem, de dieta contendo alto teor de gordura, não afetou a evolução do crescimento e desenvolvimento dos animais (Figura 1). De fato, tem sido relatado que a ausência de ácidos graxos na dieta compromete o desenvolvimento (EDELMAN, 1999; SIMOPOULOS, 2003) e até o momento, não há relato na literatura de comprometimento no crescimento e desenvolvimento de animais com esta quantidade de gordura na dieta, corroborando portanto, estes dados. Em adição, a maioria dos trabalhos abordando efeito da alteração da dieta utilizou animais adultos para seus estudos (COSTELLI, 1999; BABA, 2000) ou recém-desmamados (JEFFERY, 1996; CALDER e MILES, 2000), onde também não foi demonstrado alteração na evolução do crescimento.

O tumor para crescer necessita de energia, a qual deve ser provida pelo portador. O tumor de Walker é um ávido consumidor de glicose, produzindo como consequência altas concentrações de lactato (EMERY, 1999). Nestes animais também há alta atividade do ciclo de Cori (TISDALE, 2001). Em estados catabólicos como exemplo no câncer, pode ocorrer competição metabólica entre o organismo e o tumor, onde fatores

produzidos pelo tumor e/ou pelo próprio organismo podem reduzir a utilização de glicose pelo organismo, que levam a um balanço energético negativo com déficit em torno de 200-300 calorias/dia (ARGILES e cols., 1997; TISDALE, 1997). Mediadores tais como TNF- α e IL-1, que foram mostrados serem capazes de induzirem sintomas de caquexia, são liberados pelas células do sistema imunitário (por exemplo, monócitos/macrófagos) e também pelo tumor (CALDER 1997a; ARGILÉS e cols., 1997; ALEXANDER, 1998; BARBER, 1999a; De PABLO, 2000). Como consequência, provocam depleção dos estoques de energia (principalmente, de triacilglicerol no tecido adiposo), redução significativa no peso corpóreo e na ingestão alimentar, na concentração de glicose, colesterol total e HDL séricos, associado a glicólise anaeróbica no tumor, resultando em aumento nas concentrações de lactato sérico. Cada um destes parâmetros acontece em ratos portadores de tumor de Walker 256 (grupo W). Assim, no presente estudo, o crescimento do tumor (Figura 2) está associado à perda de 6,7% da massa corpórea (Tabela 3), 48% na redução significativa da ingestão alimentar (Figura 3), diminuição de 1,8 vezes da glicemia (Figura 4), com elevações de 2,2 vezes da laticidemia (Figura 5), e de 1,6 vezes na triacilglicerolemia (Figura 6) e diminuição de 1,7 vezes da colesterolemia (Figura 7), além de redução de 38% nas concentrações séricas de colesterol HDL (Figura 8) quando comparado ao grupo controle. Isto configura o estabelecimento do estado de caquexia no modelo de tumor de Walker 256.

Estudos epidemiológicos sugerem que dietas ricas em ácidos graxos N-3 protegem contra o câncer de mama, colon e próstata, enquanto àquelas que contém altas concentrações de ácidos graxos N-6 não protegem (SLATERRY, 1997; TERRY, 2001, SIMOPOULOS, 2003), tendo na verdade, efeito contrário. Estudos laboratoriais vêm confirmando esta relação (WIGMORE, 1996; McENTEE & WHELAN, 2002). EPA e DHA em proporção balanceada de ácidos graxos n-6:n-3, podem promover efeitos protetores contra o desenvolvimento e/ou progressão de diferentes modelos de tumor (KARMALI, 1987). Em ratos, a dieta rica em ácidos graxos saturados tem fraco efeito na promoção do crescimento de tumores de mama induzidos por carcinógenos. Os ácidos graxos n-6, por sua vez, apresentam forte promoção, enquanto os ácidos graxos n-3 mostram ações inibitórias do crescimento tumoral (CAPONE, 1997; EL-SOHEMY, 1997). Efeitos semelhantes são observados em experimentos *in vitro* com células de tumor mamário humano (TERABE e BERZOFSKY, 2004).

A melhor maneira de curar a caquexia no câncer é curando-se o câncer, contudo esta não é a opção para a maioria dos indivíduos com câncer. Modificações da dieta têm sido propostas na tentativa de melhorar a caquexia, entretanto a hiperalimentação nos indivíduos com caquexia pelo câncer tem sido desapontante, uma vez que ela resulta em ganho limitado de peso (TISDALE, 1997; BARBER, 2001). O maior crescimento tumoral está diretamente relacionado com maior grau de caquexia (TISDALE, 1997).

Estudos prévios têm demonstrado que dietas ricas em ácidos graxos n-3, usualmente na forma de óleo de peixe, podem reduzir a taxa de crescimento tumoral em vários modelos de animais, o que é contrastante com os efeitos de dietas ricas em ácidos graxos saturados ou ácidos graxos n-6 (ANTI, 1994; MEYDANI, 1996; NIXON, 1996; TASHIRO, 1998; ARONSON, 2000; TAPIERO, 2002). Os animais não portadores de tumor e suplementados com as diferentes dietas não apresentaram, entre eles, alterações quanto ao ganho de peso (Figura 1), glicemia (Figura 4), laticidemia (Figura 5), peso do baço (Figura 10) e colesterol HDL (Figura 8). Entretanto, as concentrações séricas de colesterol total (Figura 7) e triacilgliceróis (Figura 6), foram reduzidas significativamente com a suplementação com a dieta n-3. Esses dados corroboram os resultados de TOGNI e cols. (2003) que demonstraram ação semelhante entretanto, com quantidade bem menor de ácido graxo n-3, na forma de óleo de peixe, na dieta. Esta ação hipolipidêmica dos ácidos graxos poliinsaturados n-3 tem sido demonstrada em vários trabalhos (SIMOPOULOS, 1999a, ROSE & CONNOLLY, 1999). Estes ácidos graxos são hábeis em regular a função de enzimas como a lipase lipoprotéica (LPL), responsável pela clivagem dos triacilgliceróis presentes nas lipoproteínas e seu armazenamento no tecido adiposo (TISDALE, 1997; VANAJA, 2000; ARGILÉS e cols., 2003); modular a ação da enzima lipase hormônio-sensível elevando sua atividade lipolítica, (ARGILÉS e cols., 1997) e atuar na HGM-CoA redutase, importante na biosíntese do colesterol (DAS, 2002). Em resumo, nos animais sem tumor, as suplementações com os diferentes ácidos graxos e suas diferentes razões, não modificaram os parâmetros bioquímicos analisados, exceção ao TAG e colesterol.

Nos animais portadores de tumor, a suplementação com óleo de peixe (WN-3) promoveu redução de 83% na taxa de crescimento tumoral (Figura 2) quando comparada à do grupo com tumor suplementado com ração padrão (W). Isto foi acompanhado pela manutenção da ingestão alimentar similar à do C (Figura 3), da glicemia (Figura 4), das

concentrações séricas de lactato (Figura 5) e dos parâmetros lipídêmicos (Figura 6-8) e de 14,6 g no ganho de peso (Tabela 3) (5,4%) da massa corpórea. A menor taxa de crescimento tumoral poderia explicar a manutenção da glicemia porque o tumor é grande consumidor de glicose e como consequência, a manutenção da laticidemia. A lipólise é ativada através da ligação de hormônios catabólicos aos seus respectivos receptores, aumentando os níveis intracelulares de AMP cíclico a partir da adenilato ciclase. Tisdale (1996) mostrou que o tratamento com EPA é capaz de reduzir a formação do AMP cíclico dentro de adipócitos de camundongos, sugerindo uma explicação para a redução nas concentrações séricas dos triacilgliceróis, observada nos animais sem tumor, mas não nos com tumor (Figura 6).

Nos últimos 150 anos ocorreram grandes mudanças no padrão alimentar da população humana quando comparado ao de nossos antepassados (EATON, 1985; SIMOPOULOS, 1999). Essas alterações foram principalmente no aumento do consumo de ácidos graxos n-6, pela inclusão de óleos vegetais e gordura animal na alimentação. A suplementação com ácido graxo n-6, não promoveu os mesmos efeitos observados na dieta com ácido graxo n-3. Na verdade, a suplementação com óleo de girassol, rico em ácido graxo n-6, aos ratos portadores de tumor de Walker 256 (WN6) induziu a uma taxa de crescimento tumoral similar à do grupo W (Figura 2). O mesmo foi observado para os dados de parâmetros bioquímicos e de caquexia (Figura 4-9), bem como para a ingestão alimentar que foi similar à do W. Interessantemente, o outro componente de caquexia que é a massa corpórea, nestes animais houve redução de apenas -2,3 g (equivale a 0,98% da massa corpórea) do ganho de peso. Em outras palavras, apesar de apresentar todos os demais indicativos de caquexia, de alguma forma, a dieta rica em ácidos graxo poliinsaturado n-6 foi hábil em impedir uma grande perda de peso. A possível explicação para este achado pode ser devido ao maior fornecimento de calorias nos animais tratados com as dietas ricas em ácidos graxos poliinsaturados, já que estes animais consumiam 26% a mais de calorias, na forma de gordura, que os animais da dieta base.

Assim, até o momento os dados deste trabalho vão ao encontro aos da literatura, onde em resumo, tem-se que ácido graxo n-6 é pró-tumoral e o n-3 contra-tumoral. Obviamente, estas duas dietas são fictícias e não fazem parte da dieta normal de qualquer pessoa no mundo. Na realidade, o que temos é a combinação destes dois ácidos graxos na forma de razão n-6:n-3, com o adendo de que esta razão foi modificada drasticamente nos

últimos anos, como mencionado acima. Neste estudo investigou-se o efeito da incrementação desta razão sobre o crescimento tumoral e a caquexia no cancer.

Na verdade, a dieta com diferentes proporções de ácido graxo n-6:n-3 estão mais próximas a realidade da população mundial. Nosso trabalho objetivou investigar se a proporção N-6:n-3 de R6, defendida como ideal contra o crescimento tumoral, era capaz de modificar a taxa de crescimento tumoral e grau de caquexia em ratos portadores de tumor de Walker 256, suplementados a partir do desmame (21 dias) até a fase adulta. A dieta do mediterrâneo e dos esquimós da Groelândia são as mais próximas à proporção de R6, uma vez que é rica em peixes, vegetais folhosos escuros e oleaginosas, mas são praticamente impossíveis para a maioria da população (KROMHOUT, 1991; ROSE e CONNOLLY, 1999; SIMOPOULOS, 1999 e 2003). A dieta ocidental, presente na América e na Europa Ocidental, é muito próxima a proporção de 20-30:1, já que contém maiores quantidades de gordura saturada e carboidratos simples, com pouco consumo de vegetais e fibras n-6:n-3 está diretamente relacionada com doenças crônico-degenerativas, (LEONARD, 2002; WILLET, 2003).

Na abordagem de razão 6:1 (WR6), defendida por vários pesquisadores (SIMOPOULOS, 2003; CALDER, 2000; JEFFERY e cols., 1996) como a mais saudável, a taxa de crescimento tumoral não foi modificada (Figura 2) contudo, a análise dos parâmetros bioquímicos de caquexia, peso e ingestão alimentar revelaram resultados interessantes. Os dados de glicemia, laticidemia e lipidemia (Figuras 4-9) foram similares à dos animais alimentados com dieta rica em óleo de peixe (WN-3) e à dos animais sem tumor alimentados com ração padrão (C). Em adição, a ingestão alimentar (Figura 3) foi similar à do C e WN-3 e ao final de 14 dias os animais do grupo WR6 apresentaram ganho de 11 g do peso corpóreo (Tabela 3) (4% da massa corpórea). Em resumo, apesar da dieta com razão 6:1 (n-6:n-3) não ter sido hábil em diminuir a taxa de crescimento tumoral, esta foi capaz de impedir que o animal entrasse em estado de caquexia. Isto sugere que a presença dos ácidos graxos n-3, mesmo em menor quantidade que à dos ácidos graxos n-6, podem influenciar e regular o metabolismo tumoral, reduzindo suas ações catabólicas sobre o portador.

Atualmente a razão n-6:n-3 ingerida pelos ocidentais é de 30:1. Esta também não impediu a evolução do crescimento tumoral (Figura 2) e não impediu que o animal

entrasse em caquexia, conforme demonstrado nos parâmetros bioquímicos (Figuras 4-9), apresentando anorexia similar à do W (Figura 3). Entretanto, não apresentaram perda de peso, ficando com ganho positivo de 8 g de peso corpóreo (Tabela 3), representando mudança em percentagem de peso em 3%. Dados similares foram observados quando dobramos a razão para 60:1, exceto que nestes animais (WR60) foi observado perda de -4,8 g ao final de 14 dias no peso corpóreo (Tabela 3), o que significou uma variação de -0,98% da massa corpórea. Nessas duas razões, R30 e R60, a quantidade de óleo de peixe é mínima quando comparada à de óleo de girassol, sugerindo que esse consumo não é suficiente para proteção contra os efeitos do tumor. Sabe-se que as dietas ricas em ácidos graxos n-6 desviam do estado fisiológico saudável para um estado fisiológico pró-inflamatório (SIMOPOULOS, 2003), o que pode piorar a resposta ao tumor.

A dieta rica em ácido graxo n-6 contribuiu para o desenvolvimento de um estado mais anoréxico, quando comparada a dieta controle. Além disso, a alteração no peso é negativa nos animais com a dieta óleo de girassol (-0,98%), sugerindo que este menor consumo de alimentos pode ter contribuído para a perda de peso nesses animais (Tabela 3). É sabido que indivíduos caquéticos apresentam perda de massa muscular e esta perda está associada à presença de um fator indutor de proteólise (PIF) secretado pelo tumor (WALLACE, 1989; ARGILÉS, 1997; TISDALE, 2000;). Tem sido demonstrado que a degradação de proteína muscular ocorre associada ao aumento das concentrações séricas de prostaglandina E_2 , metabólito derivado do ácido araquidônico (20:4 n-6), a qual pode agir como mensageiro intracelular. O uso de anticorpos contra PIF inibiu a resposta deste eicosanóide, reduzindo em 98% a perda de massa magra em camundongos, além de não reduzir a ingestão de água e alimento (LORITE, 1997). Este pode ser um mecanismo pelo qual os animais tratados com a dieta n-6 apresentaram variação negativa de peso. Wigmore e cols., (1996) mostraram que pacientes portadores de câncer e suplementados com EPA mantiveram seu peso corporal, apresentaram aumento na ingestão alimentar e estabilização da perda de peso sugerindo que o ácido graxo n-3 possa ser um agente anti-caquético mais ativo do que o ácido graxo n-6, o que corrobora os dados deste trabalho.

A eficácia dos efeitos dos ácidos graxos n-3, principalmente o EPA, também está associada à redução do metabolismo do ácido linoléico (n-6) na formação de ácido araquidônico (AA), e esta inibição pelo EPA é dependente da quantidade de AA na dieta (McENTEE & WHELAN, 2002). O AA pode agir como sinalizador no controle da

proliferação e morte de células de mamíferos. A enzima fosfolipase A₂, através de vários estímulos como citocinas, fatores de crescimento e outros presentes no meio, libera o AA da membrana da célula. Uma vez livre dentro da célula, pode agir como mediador nas vias de sinalização, na regulação da expressão gênica e desencadear a proliferação celular excessiva (DAS, 2004). O efeito benéfico de uma dieta com baixa proporção de ácidos graxos n-6:n-3, pode ser devido aos ácidos graxos poliinsaturados n-6 e n-3 possuírem efeitos pró-tumorigênicos e anti-tumorigênicos, respectivamente, resultantes da modificação do conteúdo de AA nos tecidos e também da alteração nas vias enzimáticas responsáveis pela liberação do AA da membrana e sua conversão a eicosanóides (McENTEE & WHELAN, 2002), principalmente de prostaglandinas E₂ (PGE₂), importante fator angiogênico e catalítico envolvido na produção da síndrome da caquexia em animais portadores de tumor de Walker 256 (LEAVER e cols., 2002). Os achados do presente trabalho sugerem que a dieta rica em óleo de peixe é protetora para o desenvolvimento da caquexia, enquanto que a dieta rica em óleo de girassol não o é, corroborando dados prévios da literatura (KROMHOUT, 1990; NIXON, 1996; WIGMORE, 1996; EL-SOHEMY e cols., 1997; YANG, 1999; ARONSON, 2001; CALDER 2001b). Contudo, dieta exclusiva de óleo de peixe ou girassol é nutricionalmente inviável, principalmente pela pouca oferta de alimentos ricos somente em ácido graxos n-3 ou N6.

Vários mecanismos tem sido propostos na tentativa de explicarem as ações dos ácidos graxos n-3 na redução da caquexia em pacientes portadores de tumor, bem como redução no estímulo da proliferação celular (JEFFERY, 1997; CALDER, 2001b). Entre estes estão o aumento na taxa de peroxidação lipídica do tecido tumoral (GUTTERIDGE e HALLIWELL, 1990; SPITELLER, 2003), redução na síntese de eicosanóides próinflamatórios (TISDALE, 1997; BARBER, 2001), ações que envolvam modificação na taxa de transcrição gênica (POMPEIA, 2000; ARGILÉS, 2003), na sinalização intracelular (JIANG, 1998; WALLACE, 2001; DOMMELS, 2002), entre outros. Os efeitos líticos dos ácidos graxos poliinsaturados n-3 em células tumorais cultivadas está correlacionado com o grau de formação de produtos de peroxidação lipídica (SPITELLER, 2003). O mecanismo exato pelo qual esses produtos de peroxidação inibem o crescimento celular não é totalmente conhecido, mas em alguns casos sabe-se que após a ocorrência da peroxidação lipídica nas membranas celulares é desencadeado o processo de apoptose (LOPACZYNSKI e ZEISEL, 2001). A peroxidação lipídica tem

sido relacionada como contribuinte de várias anormalidades e patologias em diferentes celulares e tecidos (JIANG, 1991) por produzir alteração na estrutura das membranas celulares através da desorganização dos fosfolípidios de membrana (SPITELLER, 2003). É sabido que os ácidos graxos poliinsaturados são substrato para peroxidação lipídica, principalmente os da família n-3 (JIANG, 1998; HARRIS, 2002). A peroxidação lipídica no grupo WN-3 foi significativamente maior quando comparada à dos demais grupos (Figura 9). TOGNI e cols. (2003) mostraram que ratos portadores de tumor de Walker 256, suplementados cronicamente com óleo de peixe, têm concentrações significativamente mais elevadas de EPA e DHA no tecido tumoral, quando comparadas com as dos tecidos dos animais sem suplementação. Portanto, é possível que o aumento na taxa de peroxidação lipídica no tecido tumoral dos ratos WN-3 seja participante do mecanismo de menor taxa de crescimento tumoral. A taxa de peroxidação entre os grupos submetidos as diferentes dietas com razões crescentes de n-6:n-3 (WR6, WR30 e WR60) e rica em óleo de girassol (WN6) não foi diferente entre si, bem como o tamanho do tumor. Isto sugere que o ácido graxo n-6 não produz radicais livres com características tumorícidas ou pouco tumorícidas. De fato, Bartsch e Nair (2000) mostraram que quando o ácido araquidônico é substrato para a peroxidação lipídica ocorre formação de compostos de eteno, que agem em bases específicas do DNA (adenina, guanina e citosina), podendo estar associados à formação de carcinogênese em humanos e em modelos experimentais, efeitos totalmente opostos àqueles dos ácidos graxos n-3. Isto poderia explicar o maior tamanho dos tumores na dietas com presença de ácido graxo n-6 quando comparado ao dos tumores na dieta óleo de peixe.

A ação da proteína *Ras* poderia ser outro agente para explicar o menor tamanho do tumor nos ratos tratados com dieta n-3. Esta proteína é crítica para a regulação das funções celulares tais como crescimento e diferenciação celular, apoptose e sua presença na membrana é pré-requisito para transformações malignas na célula. Das, (2004) mostraram que o ácido graxo DHA (ácido docosahexaenóico - 22:6 n-3), quando comparado ao ácido linoléico (n-6), é capaz de reduzir a quantidade de proteína *Ras* na membrana e a ativação de vias de sinalização intracelular, reduzindo a ativação de mecanismos que levam ao aumento do tamanho e da diferenciação celular. Esta seria outra possibilidade pelo qual o óleo de peixe poderia estar atuando para reduzir a taxa de crescimento tumoral. Esta hipótese deve ser testada.

foram publicados com a tentativa de se elucidar as diferentes ações fisiológicas dos ácidos graxos e sua participação em doenças, principalmente nas de caráter inflamatório (ALEXANDER, 1998; CALDER e MILES, 2000).

O câncer é uma doença muito estudada, contudo a ação do sistema imunitário na detecção e no combate aos tumores ainda não é totalmente compreendida, em especial sob alteração de regime dietético. Um dos principais fatores de controle da iniciação e desenvolvimento de tumores é a chamada imunovigilância, que são células específicas do sistema imunitário, tais como linfócitos NK e macrófagos, que são responsáveis por vigiar, detectar e destruir células consideradas não próprias do organismo (TERABE e BERZOFISKY, 2004). Uma vez que estas células detectam algo errado, respondem de maneira imediata para a ativação do sistema imunitário e desencadeando a resposta específica (DE PABLO, 2000; DOMMELS, 2002). Vários parâmetros podem ser utilizados para avaliar a resposta imunitária, entre eles a alteração morfológica e a capacidade proliferativa e citotóxicas dos macrófagos e das células de tecidos linfóides como timo, baço e linfonodo mesentérico.

Diferentes estudos vêm mostrando que os lipídeos da dieta são capazes de alterar a resposta imunitária, mesmo na ausência de um estímulo externo como o câncer (ANTI, 1994; CALDER, 1997c; ARONSON, 2001; BARBER, 2001; DAS, 2004). As diferentes proporções de ácidos graxos n-6 para n-3 da dieta não modificou o padrão de resposta dos tecidos linfóides na ausência e na presença de um estímulo externo, no caso, o tumor de Walker 256. A presença do tumor no organismo é considerada um estímulo para a ativação do sistema imunitário (ROSE e CONNOLLY, 1998; CALDER, 2001b). A determinação do peso do baço em relação ao peso corporal dos animais permitiu-nos apresentar os dados na forma de índice do baço como referencial do grau de ativação. Nos animais sem tumor não houve alteração neste índice. Na presença do tumor, o peso do baço do grupo W aumentou cerca de 3,4 vezes quando comparado ao do animal controle sem tumor, sugerindo a ativação do sistema imunitário pela presença do tumor. Quando os animais foram tratados com dieta rica em óleo de peixe foi observado que o peso do baço não sofreu alteração quando comparado ao dos animais sem tumor ($p>0,05$), mas os animais tratados com dieta WN-6 apresentaram o peso do baço semelhante ao grupo W (Figura 10). Calder (2001b, 2001c) e Jeffery (1996, 1997b) mostraram que os baços apresentam menor tamanho e os linfócitos do baço menor taxa

Prostaglandinas favorecem a tumorigênese e são encontradas em maior abundância no tecido tumoral do que nos tecidos donde o câncer se originou (ROSE & CONNOLY, 1999, HARRIS e cols., 2002, CALDER, 2003). Ratos portadores de tumor de Walker 256 apresentam concentrações séricas elevadas de prostaglandinas E_2 , as quais têm sido associadas a um crescimento tumoral elevado (PINTO Jr., 2004). PGE_2 medeia a sobrevivência tumoral por inibir a apoptose da célula tumoral e induz a proliferação tumoral (HARRIS e cols., 2002). Em adição, ela altera a morfologia celular, aumenta motilidade e migração, resultando em progressão do tumor (DUNLOP, 2000).

As prostaglandinas são moléculas lipídicas potentes que afetam aspectos chaves na imunidade, mediando respostas de linfócitos T, B e células apresentadoras de antígenos. Como descrito anteriormente, as prostaglandinas e os outros eicosanóides, são derivados dos lipídeos dietéticos (Gráfico 2), e agem de maneira geral na regulação da resposta imunitária.

O sistema imunitário também desempenha papel importante na resposta tumoral e este poderia ser outro mecanismo para explicar a menor taxa de crescimento do tumor (EMERY, 1999). A PGE_2 tem habilidade de modular a resposta das células T auxiliares (Th) e um efeito pronunciado na produção de citocinas. A PGE_2 é capaz de estimular a produção de citocinas de T auxiliares 2 (Th2), tais como IL-4, IL-5 e IL-10 e inibir marcadamente a produção de citocinas de T auxiliares 1 (Th1), tais como interferon-gama e IL-2 (WALLACE e cols., 2001; HARRIS e cols., 2002). Em outras palavras, PGE_2 promove resposta imunitária humoral e Th2, as quais não participam da destruição do tumor e inibe a resposta Th1, a qual favorece a destruição do tumor. A relação entre o aumento da expressão de COX-2 e o câncer tem sido estabelecida em muitos tipos de câncer, tais como mama, cólon e próstata. Vários inibidores de ciclooxigenases têm demonstrado atividade antitumoral (TISDALE, 2000; PINTO Jr, 2004). Os ácidos graxos n-3 poderiam modular o crescimento tumoral talvez pela geração de PGE_3 ao invés da PGE_2 ou ainda pela produção de 15-dPGJ₂, a qual reduz a produção de metaloproteases, inibem a proliferação de células malignas e aumenta a apoptose (HARRIS e cols., 2002).

Há muito tempo tem-se estudado a função dos lipídeos na resposta imunitária e este estudo intensificou-se a partir da descoberta dos eicosanóides derivados do ácido arquidônico (WALLACE e cols., 1989). A partir destas informações vários trabalhos

de proliferação na presença de altas concentrações de óleo de peixe, indicando redução na atividade destes linfócitos, o que corrobora nossos resultados. Um sistema imunitário menos ativo significa menor produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como $\text{TNF-}\alpha$, IL-1, IL-6 e $\text{INF}\gamma$ (CALDER, 1997a; ALEXANDER, 1998; DUNLOP e CAMPBELL, 2000), que pode contribuir para a melhoria do quadro de caquexia nestes animais.

Os lipídeos dietéticos são componentes essenciais para todas as células, sendo importantes em várias funções tais como a integridade da bicamada lipídica, fontes energéticas, precursores de várias substâncias biológicas ativas, sinalização intracelular e outras (CALDER e cols., 1998c, BRENNAN, 2002, 2001). Alguns ácidos graxos são capazes de alterar a resposta imunitária, tais como a resposta proliferativa (CALDER, 2000), a expressão de marcadores de superfície (JEFFERY e cols., 1997) e outras respostas celulares durante estados inflamatórios, ou até mesmo em estados fisiológicos (SIMOPOULOS, 2003). No último caso, a fonte de ácidos graxos presentes na dieta foi capaz de realizar alterações marcantes nas concentrações basais de linfócitos e na presença do mitógeno Con-A. Nos tecidos estudados timo, baço e linfonodo mesentérico tiveram padrão semelhante de resposta. Nos animais não portadores de tumor, a dieta rica em óleo de peixe foi capaz de inibir a proliferação dos linfócitos T do timo do grupo N-3 quando comparado ao grupo controle (C) ($p < 0,001$) (Tabela 4). Os linfócitos do baço e dos linfonodos mesentérico dos grupos N-3 e R6 não apresentaram diferença comparada à do grupo C ($p < 0,05$), sugerindo inibição na taxa de proliferação (Tabela 6 e 8). Nos animais alimentados com dieta rica em óleo de girassol (n-6) esses efeitos não foram observados. Na verdade, o grupo N6 apresentou alta de ativação da proliferação dos linfócitos nos três tecidos estudados, tanto na ausência como na presença do mitógeno con-A. Isto sugere que a dieta rica em óleo de girassol é capaz de aumentar a reatividade destas células mesmo sem a presença de estímulo externo. Calder (1998) demonstrou que entre as dietas com alto teor de gordura, a ordem de potência inibitória dos ácidos graxos seria ácidos graxos saturados < ácidos graxos N-6 < óleo de oliva < óleo de peixe.

Quando os animais foram alimentados com dietas com diferentes razões n-6:n-3, observou-se que a dieta R6 tende a manter a resposta similar à do grupo N-3, enquanto que as dietas R30 e R60 respondem semelhantes à do N-6. Isto mostra que mesmo uma pequena quantidade de ácido graxo N-3 presente na dieta é suficiente para induzir modificações celulares, como a redução na atividade proliferativa basal dos linfócitos.

Uma vez que estas células foram estimuladas com o mitógeno Con-A, o perfil de resposta proliferativa permaneceu semelhante à basal, sendo que as dietas ricas em óleo de girassol foram capazes de aumentar sua taxa de proliferação quando comparada à de seus controles ($p < 0,001$). Já as dietas ricas em óleo de peixe não aumentaram sua taxa de proliferação (Tabela 4, 6 e 8). Vários estudos têm demonstrado resultados similares com dietas com alto teor de gordura. Jeffery e cols. (1996) mostraram que a dieta rica em ácido graxo linoléico (20% das calorias na forma de gordura), fonte de ácidos graxos n-6, aumenta a taxa de proliferação de linfócitos T do sangue quando comparados com aqueles submetidos a dietas ricas em óleo de linhaça, rico em ácidos graxos n-3. Thies e cols. (2001) mostraram que o uso de 1g de EPA + DHA, ácidos graxos n-3 de cadeia longa, além de reduzir a taxa de proliferação de linfócito T reduziram em 48% a atividade de outro tipo de linfócito, os linfócitos NK. Metabólitos derivados dos ácidos graxos n-6, mas com ação semelhante à família n-3, como a prostaglandina 15-d-PGJ₂, inibem a proliferação de linfócitos T e induzem células T de camundongos a apoptose, por mecanismo dependente de PPAR- γ , receptor presente em determinadas células imunitárias, o qual tem sido implicado com a proliferação celular e resposta inflamatória (HARRIS e cols., 2002). Outro estudo mostrou o uso de óleo de peixe na ração foi capaz de reduzir a produção de IL-2, importante fator proliferativo, em linfócitos de roedores (JOLLY e cols., 1998). Estes resultados sugerem que os ácidos graxos n-3 são mais potentes em seu efeito inibitório na atividade celular do que os ácidos graxos n-6.

Alguns mecanismos são propostos para explicar esta ação. Um deles é a síntese de eicosanóides, onde altas concentrações de ácido araquidônico e ácido linoléico presentes nas membranas celulares dos linfócitos tratados com dietas ricas em óleo de girassol podem ser liberados das membranas (ROSE E CONNOLLY, 1999) e contribuir para alterar funções celulares o que levaria ao aumento na reatividade celular. Jolly e cols. (1998) observaram que os ácidos graxos n-3 diminuem drasticamente a geração de diacilglicerol (DAG) e ceramida em linfócitos estimulados com con-A o que leva a redução na proliferação destas células. DAG e ceramida são segundos mensageiros importantes na sinalização intracelular dos linfócitos, que ativam fatores de transcrição intranucleares, estimulando a regulação da expressão gênica. Alguns estudos sugerem os ácidos graxos poliinsaturados podem agir na transdução de sinais específicos para a proliferação celular. Williams e cols. (2002) sugeriram que os ácidos graxos n-3 e n-6 podem suprimir a produção de IL-2 por alterarem etapas iniciais importantes na formação

dos RNA mensageiros de *c-fos* e *c-myc*, os quais codificam proteínas nucleares que exercem papéis importantes na regulação da expressão e da transcrição do gene para IL-2. Neste caso, os ácidos graxos n-6 apresentariam efeitos menos sensíveis do que os ácidos graxos n-3. Sanderson e Calder (1998) mostraram que o óleo de peixe reduziu, significativamente, a concentração de IP₃ (inositol trifosfato) e DAG (diacilglicerol) em linfócitos estimulados por Con-A, sugerindo redução na ativação de linfócitos do baço. Todos esses mecanismos indicam que os ácidos graxos n-3 podem agir de múltiplas maneiras na regulação do sistema imunitário.

Na presença do tumor o padrão de resposta proliferativa permaneceu semelhante à do animais sem tumor (Tabelas 5, 7 e 9). Analisando cada tecido, a taxa de proliferação nos linfócitos dos animais portadores de tumor foi maior do que à dos animais sem tumor ($p < 0,05$). Isto mostra que a presença do tumor no organismo foi detectada e está tentando ser combatida pelas células do sistema imunitário. Os linfócitos dos animais tratados com as dietas ricas em óleo de peixe (WN-3 e WR-6) não foram capazes de se proliferarem e suas taxas permaneceram semelhantes à de seus respectivos controles (Tabelas 4-9). Esses dados mostram que o óleo de peixe foi capaz de inibir a resposta proliferativa mesmo na presença do tumor, demonstrando que os ácidos graxos n-3 regulam o sistema imunitário de maneira inibitória. Um metabólito derivado do óleo de peixe, a prostaglandina 15-d-PGJ₂ age em diretamente sobre as células tumorais através da inibição da proliferação e pelo estímulo da apoptose. Um mecanismo para tal talvez seja pela inibição da ciclina D1, o que resulta na parada do ciclo-celular, seguido de apoptose (TAKASHIMA, 2001). Este mecanismo ocorre normalmente via receptores PPAR γ , uma vez que agonistas deste receptor nuclear também inibem a carcinogênese (VANAJA, 2000). Além disso, 15-d-PGJ₂ inibe a expressão de metaloproteinases-9 no tecido muscular liso vascular, reduzindo a formação de metástases (MARK, 1998). Ainda, sabe-se que óleo de peixe age reduzindo a produção de citocinas como a IL-2, reduzindo assim a ativação e proliferação dos linfócitos do sangue (WALLACE, 2001).

Os linfócitos T são células importantes na resposta mediada por células na presença de antígenos estranhos no organismo. Suas subpopulações, os linfócitos T auxiliar ou helper (Th) e os linfócitos citotóxicos (Tc) são caracterizados pela presença de marcadores de superfície que reconhecem peptídeos ligados ao MHC de células apresentadoras de antígenos (CALDER e cols., 2003). Os linfócitos Th apresentam o

marcador CD4, enquanto os linfócitos Tc apresentam o CD8 (DUNLOP, 2002). A dosagem de células positivas para CD4 e CD8 nas células dos tecidos do timo e linfonodo mesentérico mostrou que a dieta não altera significativamente a quantidade destas células em animais não portadores de tumor (Figuras 11, 13, 15 e 17). Esses dados corroboram os de Jeffery e cols. (1996) que também não encontraram diferença estatísticas nas populações de células CD4 e CD8 nas células do baço de animais tratados com diferentes proporções de ácidos graxos n-6:n-3. Interessantemente, na presença do tumor de Walker as células linfocitárias apresentaram redução na quantidade de células positivas para CD4 e CD8. Os linfócitos obtidos do timo e do linfonodo mesentérico de ratos alimentados com dieta rica em óleo de girassol (WN-6) a população de células CD4⁺ estavam significativamente menores do que a das células de animais alimentados com as dietas WN-3 ($p<0,001$) (Figura 12 e 14). Os linfócitos positivos para CD8 obtidos de ratos alimentados com dietas rica em óleo de peixe (WN3) e razão 6:1 (WR6) apresentaram percentual significativamente maior quando comparado ao dos animais alimentados com as dietas 60:1 (WR60) e a rica em óleo de girassol (WN-6) ($p<0,001$) (Figuras 16 e 18). Altas concentrações de PGE₂ podem inibir a taxa de proliferação de células T CD8⁺ via redução nas concentrações de AMP_c (HARRIS e cols., 2002), o que poderia explicar a redução desta população de células nos grupos WR60 e WN-6. Nas dietas WN-3 e WR6 a porcentagem de células positivas para CD4⁺ e CD8⁺ não foi diferente entre os animais portadores de tumor e não portadores de tumor, salvo as células CD8⁺ no linfonodo mesentérico dos animais sem tumor, que praticamente tiveram suas concentrações reduzidas pela metade. Esses dados mostram que na presença do tumor de Walker, os animais tratados com dieta rica em óleo de peixe conseguem manter inalteradas suas populações de células CD4⁺ e CD8⁺, o que poderia auxiliar na resposta imunitária contra o crescimento do tumor. Estes linfócitos secretam citocinas que promovem o aumento no número de linfócitos T circulantes, sua diferenciação e a ativação de outros tipos celulares como os linfócitos B, células NK e macrófagos, auxiliando na resposta citotóxica contra as células tumorais (CALDER e MILES, 2000; ARONSON, 2001; TISDALE, 2001; ARGILÉS, 2003).

Outra célula importante na resposta imunitária são os macrófagos por desempenharem papel importante no controle do desenvolvimento tumoral, exercendo suas atividades citotóxicas a partir da produção de TNF- α e espécies reativas do oxigênio (ROS), como radical superóxido e peróxido de hidrogênio (KLIMP e cols., 2002). A

produção de ânion superóxido (Figura 19) pelos macrófagos peritoneais obtidos dos animais alimentados com as diferentes dietas, na presença ou ausência do tumor, não foi diferente entre os grupos ($p>0,05$). Em neutrófilos isolados, foi demonstrado que o ácido araquidônico tem importante papel na produção do ânion superóxido, pois a produção deste ânion é reduzida por inibidores de fosfolipase A_2 e é abolida em células deficientes de fosfolipase A_2 citosólica e, portanto, incapazes de liberar ácido araquidônico (DAS, 2004). Isso nos leva a sugerir que como ocorre maior produção de AA nos animais suplementados com ácidos graxos poliinsaturados n-6, também deva ocorrer maior produção de ânions superóxido.

Quando um ânion superóxido reage com outro superóxido, temos a formação de uma substância estável, o peróxido de hidrogênio (SPITLLER, 2003). Em relação ao peróxido de hidrogênio (figura 20) houve aumento significativo na produção de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais obtidos dos animais nos animais sem tumor alimentados com as diferentes dietas quando comparada à dos alimentados com ração padrão (C). O maior aumento foi com a dieta n-3 (N-3), razão 6:1 (R6) e 30:1 (R30), que não foram diferentes entre si, mas foram maiores que a dos com dieta 60:1 (R60) e dieta n-6 (N-6) ($p<0,05$). Estes dados corroboram os de YAQOOB e cols., (1995), que fizeram estudo com macrófagos peritoniais de camundongos alimentados por 8 semanas com 200 g/kg de óleo de peixe. Nos animais com tumor, todos os grupos produziram significativamente mais peróxido de hidrogênio quando comparado aos seus grupos sem tumor ($p<0,05$), indicando maior grau de atividade celular (THIES e cols., 2001). O padrão da resposta dos macrófagos foi similar ao dos animais sem tumor. Esses dados mostram que a presença do tumor modifica a taxa de produção desta substância sugerindo que a dieta rica em ácidos graxos n-3 pode contribuir para maior atividade citotóxica dos macrófagos.

Mudanças nas concentrações de $TNF-\alpha$ e da PGE_2 também podem mudar o perfil do óxido nítrico (TERABE e BERZOFISKY, 2004). Esta é uma molécula gasosa simples encontrada no ar atmosférico em pequenas quantidades, altamente tóxica por ser um radical livre, que a torna muito reativa. Essa pequena molécula, talvez a menor produzida pelos mamíferos é produzida por muitos tipos de células e com várias funções, dentre elas imunomodulação, antimicrobiana, antiparasitária e antitumoral (THIES e cols, 2001; CALDER e cols., 2002). Nos animais sem e com tumor, alimentados com as dietas ricas

em óleo de peixe N3 e R6, houve aumento significativo ($p<0,05$) na concentração de óxido nítrico produzido pelos macrófagos. Os macrófagos peritoneais dos animais portadores de tumor, as dietas ricas em óleo de peixe (WN-3 e WR6) também produziram maiores quantidades de óxido nítrico quando comparadas à dos outros grupos portadores de tumor ($p<0,05$) (Tabela 10). Uma possível explicação para este achado é que dietas ricas em óleo de peixe podem mudar as concentrações de $\text{TNF-}\alpha$ e da PGE_2 . Trabalhos realizados por CHAET e cols., (1994), com macrófagos broncoalveolares de ratos, alimentados com dieta rica em óleo de peixe (18%) ou óleo de açafrão (n-6), por 12 dias, também tiveram aumento na produção de óxido nítrico, quando comparado ao do grupo controle. Outra possível explicação para que o óxido nítrico esteja aumentado nos grupos tratados com a dieta rica em óleo de peixe é de que as enzimas que resultam na síntese de ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico são reguladas por eicosanóides, citocinas e proteína quinase C. Como os ácidos graxos n-3 afetam a produção de eicosanóides e citocinas e, estas afetam a produção das espécies reativas do oxigênio e óxido nítrico dos macrófagos, estes compostos (ROS e NO), portanto, são capazes de regular as atividades citotóxicas dos macrófagos (CALDER, 2001c; WALLACE e cols., 2000; CALDER, 2002).

Esses resultados sugerem que o óleo de peixe age como agente inibidor da proliferação linfocitária e regulador da atividade dos macrófagos, reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, o que melhoraria o quadro geral dos animais portadores de tumor. Porém, como a ação do óleo de peixe é inibitória sobre o sistema imunitário, nossos resultados sugerem que a redução da taxa de crescimento tumoral e manutenção dos parâmetros de caquexia deva ser realizada por via direta sobre o tumor e o sistema imunitário talvez funcione como coadjuvante.

As discrepâncias encontradas entre nossos resultados e os da literatura mostram que ainda não é possível afirmar quais os efeitos específicos dos ácidos graxos poliinsaturados no câncer. Isso pode ser explicado pela diferença nos protocolos utilizados, modelos experimentais, tipos de ácidos graxos, doses fornecidas, tempo de tratamento e tipo de câncer estudado. No modelo experimental utilizado, os resultados sugerem que dieta com alto teor de gorduras, com proporção de ácidos graxos n-3:n-6 de R6 foi capaz de reduzir a caquexia e a anorexia de ratos portadores de tumor, inibindo a

ativação dos linfócitos e aumentando a ação citotóxica dos macrófagos, sugerindo efeito indireto sobre estas células.

6. CONCLUSÃO

No presente estudo, concluímos que a suplementação com a dieta com proporção de ácidos graxos n-6: n-3 de R6 ao longo da vida em ratos portadores de tumor de Walker 256:

- 1) não foi protetora para crescimento tumoral, mas impediu o desenvolvimento de caquexia bem como de anorexia;
- 2) a proliferação dos linfócitos obtidos do timo, baço e linfonodo mesentérico não se comporta da mesma forma pela presença do tumor;
- 3) foi hábil em manter as concentrações dos marcadores de superfície CD4+ e CD8+;
- 4) promoveu aumento da produção de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico pelos macrófagos.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ALEXANDER J. W. Immunonutrition, the role of N3 fatty acids. **Nutrition**, 14, 627-633, 1998.

ANTI M. Effects of different doses of fish oil on rectal cell proliferation in patients with sporadic colonic adenomas. **Gastroenterology**, , 107, 1709-1718, 1994.

ARGILES J. M. , ALVAREZ B. , LOPEZ-SORIANO F. J. The metabolism basis of cancer cachexia. **Medicinal Research Reviews**, 17(5), 477-498, 1997.

ARGILES J. M. , MOORE-CARRASCO, R. , FUSTER, G. , BUSQUETS, S. , LOPEZ-SORIANO F. J. Cancer cachexia, the molecular mechanisms. **IJBCB**, 35, 405-409, 2003.

ARONSON W. J. Modulation of n-3/n-6 polyunsaturated ratios with dietary fish oil in men with prostate cancer. **Urology**, 58 (2), 283-288, 2001.

BABA, N. H. , GHOSSOUB, Z. , HABBAL, Z. Differential effects of dietary oils on plasma lipids, lipid peroxidation and adipose tissue lipoprotein lipase activity in rats. **Nutrition Research**, 20(8), 1113-1123, 2000.

BARBER M. D. , ROSS J. A. , FEARON K. Cancer cachexia. **Surgical Oncology**, 8, 133-141, 1999a.

BARBER M. D. The effects of an enteral supplement enriched with fish oil on weight-loss in patients with pancreatic cancer. **British Journal of Cancer**, 81(1), 80-86, 1999b.

BARBER M. D. Cancer cachexia and its treatment with fish-oil-enriched nutritional supplementation. **Nutrition**, 17, 751-755, 2001.

BARTSCH, H. , NAIR, J. New DNA-based biomarkers for oxidative stress and cancer chemoprevention studies. **European Journal of Cancer**, 36, 1229-1234, 2000.

BOUDREAU M. D. , CHANMUGAN P. S. , HART S. B. Lack of dose response by dietary N3 fatty acids at a constant ratio of N3 to N6 fatty acids in suppressing eicosanoid synthesis from arachidonic acid. **American Journal of Clinic Nutrition**, 54(1), 110-117. 1991.

BRENNA, J. T. Efficiency of conversion of α -linoleic acid to long chain n-3 fatty acids in man. **Current Opinion in Nutritional Metabolic Care**, 5, 127-135, 2002.

CALDER P. C. N3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity, pouring oil on trouble waters or another fishy tale? **Nutrition Research**, 21, 309-341, 2001a.

CALDER P. C. The ratio of N6 to N3 fatty acids in the diet, impact on T lymphocytes function. **European Journal of Lipid Science and Technology**, 103, 390-398. 2001b.

CALDER P. C. The effects of dietary polyunsaturated fatty acids on the immune response and susceptibility to infection. *Nutrition, Immunity and Infection in Infants and*

Children. Edited by Robert M. Suskind and Kraisid Tontisirin. **Nestlé Nutrition Workshop Series, Pediatric Program**, 46,137-172, 2001c.,

CALDER P. C. , DAVIS J. , YAQOOB P. , NEWSHOLME E. A. Dietary fish oil suppress human colon tumour growth in athymic mice. **Clinical Science**, 94, 303-310, 1998a.

CALDER, P.C. N3 Polyunsaturated fatty acids and mononuclear phagocyte function. **Medicinal Fatty Acids in Inflammation**. Edited by J. Kremer, 1998b.

CALDER, P.C. Dietary fatty acids and the immune system. **Nutrition reviews**. **56**,S70-S83, 1998c.

CALDER P. C. N3 Polyunsaturated fatty acids and cytokines production in health and disease. **Metabolism**, 41(4), 203-234, 1997a.

CALDER P. C. N3 Polyunsaturated fatty acids as pharmacologic agents, a fishy tale? **Nutrition**, (13), 1002-1004, 1997b.

CALDER P. C. N3 polyunsaturated fatty acids and immune cell function. **Advanced Enzyme Regulation**, 37, 197-237, 1997c.

CALDER P. C. , MILES E. A. Fatty acids and atopic diseases. **Pediatric, Allergy and Immunology**, 11, 29-36, 2000.

CALDER P.C., YAQOOB P. , THUIES, F., WALLACE, F. A., MILES, E. A. fatty acids and lymphocyte function. **British Journal of Nutrition**, 87, 31-48, 2002.

CAPONE S. , BAGGA D. , GLASPY J. A. Relationship between omega-3 and omega-6 fatty acids ratio and breast cancer. **Nutrition**, 13(9), 822-824, 1997.

CARBÓ, N. , BUSQUETS, S. , Van ROYEN, M. , ALVAREZ, B. , LOPEZ-SORIANO F. J. , ARGILES J. M. TNF- α is involved in activation DNA fragmentation in skeletal muscle. **British Journal of Cancer**, 86(6), 1012-1016, 2002.

CAYGILL C. , HILL M. J. Fish, N3 fatty acids and human colorectal and breast cancer mortality. **European Journal of Cancer Prevention**, 4, 329-332, 1995.

COMPTON, S. J. & JONES, C.G. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. **Annals of Biochemistry**, 151, 369-374, 1985.

COSTELLI, P. , TESSORI, L. , BATETTA, B. , MULAS, M. F. , SPANO, O. , PANI, P. , BACCINO, F. , DESSI, S. Alterations of lipid and cholesterol metabolism in caquectic tumor-bearing rats are prevented by insulin. **Nutrient Metabolism**, 129, 700-706, 1999.

De PABLO M. A. Immune cell functions, lipids and host natural resistance. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, 29, 323-328, 2000.

DAS U. N. Estrogens, statins, and polyunsaturated fatty acids, similarities in their actions and benefits – is there a common link? **Nutrition**, 18, 178-188, 2002.

DAS U. N. Perinatal supplementation of long-chain polyunsaturated fatty acids, immune response and adult diseases. **Medicinal Science Monitor**, 10(5), 19-25, 2004.

DIETARY REFERENCE INTAKES, Institute of Medicine, National Research Council, National Academy of Sciences. Washington, D.C. National Academy Press, 1999.

DOMMELS Y. E. M. , ALINK G. M. , van BLADERN P. J. , van OMMEN B. Dietary N6 and N3 polyunsaturated fatty acids and colorectal carcinogenesis, results from cultured colon cells, animals models and human studies. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. 2002.

DUNLOP R. J. , CAMPBELL C. W. Cytokines and advanced cancer. **Journal of Pain and Symptom Management**, 20(3), 214-232, 2000.

EATON, S. B. , KONNER, M. Paleolithic nutrition. A consideration of its nature and current implications. **New England Journal of Medicine**, 312,283-289, 1985.

EDELMAN M. J. , GANDARA D. R. , MEYERS F. J. , ISHII R. , O'MAHONY M. , UHRICH M. , LAUDER I. , HOUSTON J. , GIETZEN D. W. Serotonergic blockade in the treatment of the cancer anorexia-cachexia syndrome. **Cancer**, 15, 86(4), 684-688, 1999.

EL-SOHEMY A. , ARCHER M. C. Regulation of mevalonate synthesis in rat mammary glands by dietary N3 and N6 polyunsaturated fatty acids. **Cancer Research**, 57(17), 685-3687, 1997.

EMERY, P. W. Cachexia in experimental models. **Nutrition**, 15, 7-8, 1999.

ENGEL & JONES J. B. Causes and elimination of erratic blanks in enzymatic metabolite assays involving the use of NAD in alkaline Hidrazina buffers, improved conditions of L- Glutamato, L-Lactate, and other metabolites. **Annals of Biochemistry**, 88, 475-484, 1978.

GIACOSA, A. , FRASCIO, F. , SUKKAR, G. , RONCELLA, S. Food intake and body composition in cancer cachexia. **Nutrition**, 12,S20-S23, 1996.

GOGOS C. A. Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids plus vitamin E restore immunodeficiency and prolong survival for severely ill patients with generalized malignancy. **Cancer**, 82(15), 395-402, 1998.

GUAITANI A. Two lines of Walker carcinoma 256, their peculiarities and different interactions with the host. **Tumorigenesis**, 69, 1-9, 1983.

GUIMARÃES A. R. P. Influência das dietas ricas em ácidos graxos poliinsaturados e saturados sobre a sistema imunológico – Estudo do metabolismo e funcionalidade de linfócitos e macrófagos. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 1992.

GUTTERIDGE, J. , HALLIWELL, B. The measurement and mechanism of lipid

peroxidation in biological systems. **Trends in Biochemical Sciences**, 15(4), 129-135 1990.

HARRIS, S.G., PADILLA, J., KOUMAS, L., RAY, D., PHIPPS, P. Prostaglandines as modulators of immunity. **Trends in immunology**, 23(3), 144-150, 2002.

HILDEBRAND, R., JANSEN, C., WOLF, G. Transforming growth factor b stimulates urokinases expression in tumor-associated macrophages of the breast. **Lab Invest.** 78, 59, 1998. In, KLIMP, A.H., VRIES, E.G.E., SCHERPHOF, G.L, DAEMEN, T. A potencial role of macrophage activation in the treatment of cancer. **Oncology Hematology**, 44, 143-161, 2002.

INDU M. , GUAFOORUNISSA. N3 fatty acids in Indians diets – comparison of the effects of precursor (alpha-linolenic acid) vs product (long chain N3 polyunsaturated fatty acids). **Nutrition Research**, 12, 569-582, 1992.

JEFFERY N. M. Effects of variations in the proportions of saturated, monosaturated and polyunsaturated fatty acids in the rat diet on spleen lymphocyte functions. **The British Journal of Nutrition**, 77 (5), 805-823, 1997a.

JEFFERY N. M. Level of polyunsaturated fatty acids and the N6 to N3 polyunsaturated fatty acids in the rat die cols.,ter serum lipid levels and lymphocyte functions. **Prostaglandins, Leukotrienes, and Essencial Fatty Acids**, 57 (2), 149-160, 1997b.

JEFFERY N. M. The ratio of N6 to N3 polyunsaturated fatty acids in the rat die cols.,ter serum lipid levels and lymphocyte functions. **Lipids**, 31, 737-745 1996.

JIANG, Z. , WOLLARD, A. , WOFF, S. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe^{2+} in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and na iodometric method. **Lipids**, 26 (10), 853-856, 1991.

JIANG W. G. , BRYCE R. P. , HORROBIN D. F. Essential fatty acids, molecular and cellular basis of their anti-cancer action and clinical implications. **Oncology Hematology**, 27, 179-209, 1998.

JOLLY C.A. , McMURRAY D. N. , CHAPKIN R. S. Effects of dietary N3 fatty acids on interleukin-2 and interleukin-2 receptor expression in activated murine lymphocytes (CD25). **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, 58,289-293, 1998.

KARMALI R. A. Historical perspective and potential use of N3 fatty acids in therapy of cancer cachexia. **Nutrition**, 12, S2-S4, 1996.

KITCHENER, S. J. , DOURISH, C. T. An examination of the behavioural specificity of hypophagia induced by 5HT-_{1B} , 5HT-_{1C} and 5HT₂ receptor agonist using the post-prandial satiety sequence in rats. **Psychopharmacology**, 113,369-377, 1994.

KLIMP, A.H., VRIES, E.G.E., SCHERPHOF, G.L, DAEMEN, T. A potencial role of macrophage activation in the treatment of cancer. **Oncology Hematology**, 44, 143-161, 2002.

KROMHOUT D. The importance of N6 and N3 fatty acids in carcinogenesis. **Medical Oncology Tumor Pharmacother**, 7(2-3), 173-176, 1990.

LEAVER, H. A., RIZZO, M. T., WHITTLE, I. R. Antitumor actions of highly unsaturated fatty acids: cell signalling and apoptosis. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, 66 (1), 1-3, 2002.

LEONARD, W. Food for thoughts. **Scientific American**, december, 74-83, 2002.

LOPACZYNSKI W., ZEISEL S.H. Antioxidants, programmed cell death and cancer. **Nutrition Research**, 21 295-307, 2001.

LORITE, M. J. , CARIUK, P. , TISDALE, M. J. Induction of muscle protein degradation by a tumour factor. **British Journal of Cancer**, 76(8), 1035-40, 1997.

MADHAVI, N., DAS, V.N. Effects of N3 and N6 fatty acids on the survival of vinorelbine sensitive and resistant human cervical carcinoma cells, in vitro. **Cancer Letters**. 84, 31-41, 1994.

MARK N. Peroxisome proliferator activated receptor activators inhibits gene expression and migration in human vascular smooth muscle cells. **Surgical research**, 83, 1097-1103. 1998.

MCENTEE, M. F., WHELAN, J. Dietary polyunsaturated fatty acids and colorectal neoplasia. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 56 (8), 380-387, 2002.

MEYDANI S. N. Effects of (N3) polyunsaturated fatty acids on cytokine production and their biologic function. **Nutrition**, 12, S8-S14, 1996.

NIXON D. W. Cancer, cancer cachexia and diet, lessons from clinical research. **Nutrition**, 12(1), 52S-56S, 1996.

PLATA-SALAMÁN, C. R. Central nervous system mechanisms contributing to the cachexia-anorexia syndrome. **Nutrition**, 16, 1009-1012, 2000.

PICK, E., MIZEL, M. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. **Journal of Immunological Methods**, 46, 211-226, 1981.

PINTO-JR, J. A., FOLADOR, A. , BONATO, S. , AIKAWA, J. , YAMAZAKI, R. K. , PIZATO, N. , FACIN, M. , GROHS, H. , OLIVEIRA, H. , NALIWAICO, K. , FERRAZ, A. , NISHIYAMA, A. , FERNANDEZ, R. , CURI, R. , FERNANDES, L. C. Fish oil supplementation in fl generation associated to naproxen, clenbuterol and insulin administration reduce tumor growth and cachexia in walker 256 tumor-bearing rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 15, 358-365, 2004..

POMPÉIA C. Effects of fatty acids on leukocyte function. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 33, 1255-1268, 2000.

RAO, C.V., HIROSE, Y., INDRANIE, C., REDDY, B.S. Modulation of experimental colon tumorigenesis by types amounts of dietary fatty acids. **Cancer Research**, 61,1927-1933, 2001.

ROSE D. P. , CONOLLY J. M. Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. **Pharmacology and Therapeutics**, 83, 217-244, 1999.

SANDERSON P., CALDER P. C. Dietary fish oil appears to prevent the activation of phospholipase C- γ in lymphocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1392, 300-308, 1998.

SAUER, L.A., DAUCHY, R.T., BLASK, D.E. Mechanism for the antitumor and anticachectic effects of N3 fatty acids. **Cancer Research**, 60, 5289-5295, 2000.

SIMOPOULOS A. P. Essential fatty acids in health and chronic disease. **American Journal of Clinic Nutrition**, 70, 560S-569S,1999a.

SIMOPOULOS A. P. Evolutionary aspects of Omega-3 fatty acids in the food supply. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, 60(5-6), 421-429. 1999b.

SIMOPOULOS A. P. The importance of ratio of mega-6/omega-3 essential fatty acids. **Biomedical Pharmacotherapy**, 56 (8), 365-379, 2003.

SPITELLER, G. Are lipid peroxidation process induced by changes in the cell wall structure and how are these processes connected with diseases. **Medical Hypothesis**, 60, 69-83, 2003.

SLATERRY M. Dietary fats and colon cancer, Assessment of risk associated with specific fatty acids. **International Journal of Cancer**, 73(5), 670-677, 1997.

STUEHR, P. J., MARLETTA, M. A. Mammalian nitrate biosynthesis, mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to Escherichia coli lipopolysacchaide. **Proceedings of National Academy Science**, 82, 7738-7742, 1985.

SUNDERKOTTER, C., STEINBRINK, K., GOEBELER, M., BHARDWAJ, R., SORG, C. Macrophages and angiogenesis. **Journal of Leukocyte Biology**. 55,410-420, 1994.

TAKASHIMA T. PPAR- γ ligands inhibits growth of human esophageal adenocarcinoma cells trough induction of apoptosis, cell-cycle arrest and reduction of ornithine decarboxylase activity. **International Journal of Oncology**, 19, 465-471, 2001.

TAPIERO H. Polyunsaturated fatty acids (PUFAS) and eicosanoids in human health and pathologies. **Biomed Pharmacother**, 56 (5), 215-222 2002.

TASHIRO T. , YAMAMORI H. , TAKAGI K. e cols., N3 versus N6 polyunsaturated fatty acids in critical illness. **Nutrition**, 14(6), 551-553, 1998.

TASHIRO T. N3 Polyunsaturated fatty acids in surgical nutrition. **Nippon Geka Gakkai Zasshi**, 99(4), 256-263, 1998.

TERABE M. , BERZOFSKY J. A. Immunoregulatory T cells in tumor immunity. **Current Opinion in Immunology**, 16, 157-162, 2004.

TERRY P. Fatty fish consumption and risk of prostate cancer. **The Lancet**, 357 (9270), 1764-1766, 2001.

TERRY P. , BERKVIST L. , HOLMBERG L. , WOLK A. No association between fat and fatty acids intake and risk of colorectal cancer. **Cancer Epidemiological Biomarkers Preview**, 10, 913-914, 2001.

THIES, F., NEBER-VONB-CARON, G., POWELL, J., YAQOOB, P., NEWSHOLME, E. A., CALDER, P. C. dietary supplementation with eicosapenatenoic acid, but not with other long chain n-3 or n-6 polyunsaturated fatty acids, decreases natural killer cell activity in healthy subjects aged > 55y. **American Journal of Clinic Nutrition**, 73, 539-548, 2001.

TISDALE M. J. Cancer cachexia, metabolic alterations and clinical manifestations. **Nutrition**, 13, 1-7. 1997.

TISDALE M. J. Inhibition of lipolysis and muscle protein degradation by EPA in cancer cachexia. **Nutrition**, 12, S31-S33, 1996.

TISDALE M. J. Metabolic abnormalities in cachexia and anorexia. **Nutrition**, 16, 1013-1014, 2000,.

TISDALE M. J. Cancer anorexia and cachexia. **Nutrition**, 17, 438-442, 2001.

TOGNI V, OTA CCC, FOLADOR A, TCHAIKOVISKI JR O, AIKAWA J, e cols.,, Cancer cachexia and tumor growth reduction in Walker 256 tumor-bearing rats supplemented with N3 polyunsaturated fatty acids for one generation. **Nutrition and Cancer**. 46, 52-58, 2003.

TRINDER R. Determination of glucose in the blood using glucose oxidase with alternative oxygen acceptor. **Annals of Clinical Biochemistry**, 6, 24-27, 1969.

VANAJA D. K. Tumor prevention and antitumor immunity with heat-shock protein 70 induced by 15-d-PGJ₂ in transgenic adenocarcinoma of mouse prostate. **Cancer Research**, 60, 4714-4718, 2000.

WALLACE F. A. , MILES E. A., EVANS C. , STOCK T. , YAQOOB P. , CALDER P. Dietary fatty acids influence the production of Th1- but not Th2-type cytokines. **Journal of Leukocyte Biology**, 69, 449-457, 2001.

WALLACE F. A. , NEELY, S. J., MILES E. A., CALDER P. Dietary fats affect macrophage-mediated cytotoxicity towards tumor cells. **Immunology and Cell Biology**, 78, 40-48, 2000.

WALLACE J. L. , KEENAN C. M. , FINN N. J. Anti-inflammatory effects of fish oil in a rat model of crohnic colitis. **Gastroenterology**, 96, A535, 1989.

WIGMORE S. J. The effect of polyunsaturated fatty acids on the progress of cachexia in patients with pancreatic cancer. **Nutrition**, 12, S27-S30, 1996.

WILLET, W. , STAMPFER, M. Rebuilt the food pyramid. **Scientific American**, January, 52-59, 2003.

YANG Y. J. Comparison of fatty acids profile in the serum of patients with prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. **Clinical Biochemistry**, 32, 405-409, 1999.

YAM, D., PELED, A., SHINITZKY, M. Suppression of tumor growth and metastasis by dietary fish oil combined with vitamins E and C and cisplatin. **Cancer Chemotherapy Pharmacology**, 47, 34-40, 2001.

YAQOOB P., CALDER, P.C. The effects of dietary lipid manipulation on the production of murine T cell-derived cytokines. **Cytokine**, 7 (6), 548-553, 1995.

YOUNG, C., GEAN, P.W., WU, S.P., LIN, C.H., SHEN, Y.Z. Cancellation of low frequency stimulation- induced long-term depression by docosahexaenoioc acid in rat hippocampus. **Neuroscience Letters**, 247, 198-200, 1998.